

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
ÁREA BIOLOGÍA MOLECULAR

**Participación de residuos aromáticos
en la estructura y función de flavoproteínas**

Lic. Adrián Kimei Arakaki

Tesis para optar al título de Doctor

Director: Dr. Eduardo Augusto Ceccarelli

2000

A Susi

A mis padres

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Eduardo Ceccarelli por haberme dirigido en la elaboración de esta Tesis, por haberme brindado la posibilidad de integrarme al grupo de Biología Molecular, y muy especialmente por haberme ofrecido su amistad.

A todos los integrantes del viejo grupo de Biología Molecular de 1990 que aún siguen en nuestro subsuelo, y a los que han seguido sus propios caminos. Especialmente a Néstor Carrillo por su generosidad, su sabiduría y su paciencia inagotables, a Nora Calcaterra por haberme guiado junto con Eduardo en mis primeras incursiones científicas, a Jorgelina Ottado, por su compañerismo, su amistad y su gran espíritu de trabajo durante los años que compartimos la mesada, a Adriana Krapp, por su humildad y por brindarme su amistad y a Esteban Serra, por ser siempre un interlocutor interesante.

A Daniela Rial, por la gran amistad que pudimos forjar en dos años de trabajo compartidos, que por lo intensos parecieron muchos más, a Elena Orellano, por su cariño, su colaboración en parte de los trabajos que aquí se exponen y por su buena predisposición incondicional, a Néstor Cortez, por su amistad, por sus certeros consejos y muy especialmente por aquella charla del año 1997 que culminó en mi proyecto de especialización en Bioinformática, a Estela Valle, por su contagioso espíritu de superación, y a todos los integrantes de BM, en especial a los habitantes del Laboratorio 3, por ser cómplices y testigos de los momentos de alegría que matizaban las tareas cotidianas.

A todos mis compañeros de Microbiología y de Biofísica, a mis ex-compañeros de Licenciatura en Biotecnología, a Alejandro Viale, por confiar en mí cuando incursionamos en la Filogenia Molecular, a Pablo Aguilar, por estar a veces de buen humor, a los miembros del Grupo Bolas Doradas, por soportar mis convicciones mecanicistas y al Grupo de los Jueves, por saber comprender mis ausencias.

Por último quiero agradecer a mi familia, por brindarme su apoyo en todo momento y muy especialmente a Susi, porque sin su compañía no hubiera encontrado motivos para muchos de los esfuerzos realizados en mi vida.

Parte de los resultados que se describen en esta tesis han sido dados a conocer previamente en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

PUBLICACIONES

1. Viale, A.M. & Arakaki, A.K. (1994) The Chaperonin Connection to the Origins of the Eukaryotic Organelles. *FEBS letters* **341**, 146-151.
2. Viale, A.M., Arakaki, A.K., Soncini, F.C. & Ferreyra, R.G. (1994) Evolutionary Relationships among Eubacterial Groups as Inferred from GroEL (Chaperonin) Sequence Comparisons. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 527-533.
3. Ottado, J., Arakaki, A.K., Calcaterra, N.B. & Ceccarelli, E.A. (1994) Expression, Assembly and Secretion of a Fully Active Plant Ferredoxin-NADP⁺ Reductase by *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **225**, 677-685.
4. Carrillo, N., Calcaterra, N.B., Krapp, A.R., Arakaki, A.K., Ottado, J., Serra, E., Orellano, E.G. & Ceccarelli, E.A. (1994) From Photosynthesis To Nitrogen Assimilation. A perspective on Plant Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreductases. *Plant Physiology. (Life Science Advances)* **13**, 295-303.
5. Arakaki, A.K. & Viale, A.M. (1995) Origins of Organelles in Plants and Algae As Inferred From Comparisons of Highly Conserved Chaperone Proteins. En *Progress Research in Photosynthesis* (P. Mathis, editor) Kluwer, Dordrecht, 971-974.
6. Ottado, J., Calcaterra N.B., Arakaki, A.K., Orellano, E.G., Carrillo, N. & Ceccarelli, E.A. (1996) On the Role of Aromatic Amino Acids Interacting with FAD in Plant-type Ferredoxin-NADP⁺ Reductases. En *Flavins and Flavoproteins 1996* (K.J. Stevenson, V. Massey and C.H. Williams, Jr., editores.) University of Calgary Press, Calgary, Canada, 501-504.
7. Arakaki, A.K., Ceccarelli, E.A. & Carrillo, N. (1997) Plant-type Ferredoxin-NADP⁺ Reductases: A Basal Structural Framework and a Multiplicity of Functions. *FASEB Journal* **11**, 133-140.

8. Dionisi, H.M., Checa, S.K., Krapp, A.R., Arakaki, A.K., Ceccarelli, E.A., Carrillo, N. & Viale, A.M. (1998) Cooperation of the DnaK and GroE Chaperone Systems in the Folding Pathway of Plant Ferredoxin-NADP⁺ Reductase Expressed in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **251**, 724-728.
9. Deng, Z., Aliverti, A., Zanetti, G., Arakaki, A.K., Ottado, J., Orellano, E.G., Calcaterra, N.B., Ceccarelli, E.A., Carrillo, N. & Karplus, P.A. (1999) A Productive NADP⁺ Binding Mode of Ferredoxin-NADP⁺ Reductase Revealed by Protein Engineering and Crystallographic Studies. *Nature Structural Biology* **6**, 847-853.
10. Medina, M., Gómez-Moreno, C., Cammack, R., Arakaki, A.K., Carrillo, N. & Ceccarelli, E.A. (1999) Advanced EPR Spectroscopic Studies of Mutants of Ferredoxin-NADP⁺ Reductase from Pea. En *Flavins and Flavoproteins 1999* (S. Ghisla, K. Kroneck, P. Macheroux and H. Sund, editores) Rudolf Weber, Berlin, Germany, 87-90.
11. Piubelli, L., Aliverti, A., Zanetti, G., Arakaki, A.K., Carrillo, N., Ceccarelli, E.A. & Karplus, P.A. (1999) Role of the C-terminal Tyrosine of Plant Ferredoxin-NADP⁺ Reductase in NADP⁺ Binding Affinity and Pyridine Nucleotide Specificity. En *Flavins and Flavoproteins 1999* (S. Ghisla, P. Kroneck, P. Macheroux and H. Sund, editores) Rudolf Weber, Berlin, Germany, 269-272.
12. Piubelli, L., Aliverti, A., Arakaki, A.K., Carrillo, N., Ceccarelli, E.A., Karplus, P.A. & Zanetti, G. (2000) Competition between C-terminal Tyrosine and Nicotinamide Modulates Pyridine Nucleotide Affinity and Specificity in Plant Ferredoxin-NADP⁺ Reductase. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 10472-10476.

REUNIONES CIENTÍFICAS

1. Arakaki, A.K., Calcaterra, N.B., Carrillo, N., Ceccarelli, E.A., Krapp, A.R., Marano, M.R., Orellano, E.G., Ottado, J. & Serra, E.C. (Junio 1991) **Regulación de la Expresión de Genes Nucleares y Plastídicos durante la Diferenciación Celular en Plantas Superiores. Análisis del Proceso de Fructificación.** Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal; Vaquerías, Córdoba.
2. Arakaki, A.K., Calcaterra, N.B., Ottado, J. & Ceccarelli, E.A. (Noviembre 1992) **Expresión y Secreción de una Proteína de Origen Vegetal en Levaduras.** XII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Rosario, Santa Fe.
3. Ottado, J., Arakaki, A.K., Calcaterra, N.B. & Ceccarelli, E.A. (Noviembre 1992) **Secreción de una Flavoproteína de Arveja en Forma Activa por *Saccharomyces cerevisiae*.** XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB). Huerta Grande, Córdoba.
4. Serra, E.C., Orellano, E.G., Calcaterra, N.B., Ottado, J., Arakaki, A.K., Krapp, A.R., Ceccarelli, E.A. & Carrillo, N. (Septiembre 1993) **Estudio del Importe, Procesamiento y Ensamble de Proteínas de Plástidos de Plantas Vasculares.** I Jornadas de Investigación de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo, Santa María, Brasil.
5. Ferreyra, R., Dionisi, H., Arakaki, A.K. & Viale, A. (Noviembre 1993) **Chaperones Moleculares de *Chromatium vinosum*.** XXIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB). Carlos Paz, Córdoba.
6. Arakaki, A.K. & Viale, A. (Noviembre 1993) **Chaperones Moleculares como Cronómetros Evolutivos.** XIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Rosario, Santa Fe.
7. Arakaki, A.K., Ottado, J. & Ceccarelli, E.A. (Noviembre 1995) **Determinación de Actividad Enzimática Utilizando IgG Inmovilizadas sobre Membranas de Nylon.** XV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Rosario, Santa Fe.

8. Arakaki, A.K., Orellano, E.G., Ottado, J., Calcaterra, N.B. & Ceccarelli, E.A. (Noviembre 1996) **Rol del Aminoácido Tirosina 89 en la Fijación de FAD a Ferredoxina-NADP⁺ Reductasa de Arveja.** XVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Rosario, Santa Fe.
9. Arakaki, A.K., Orellano, E.G., Ottado, J., Calcaterra, N.B., Carrilo, N. & Ceccarelli, E.A. (Noviembre 1997) **Interacción de los Residuos Tyr89 y Tyr308 con el Grupo Prostético FAD en la Ferredoxina-NADP⁺ Reductasa de Arveja.** XXXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB). Villa Giardino, Córdoba.
10. Deng, Z., Arakaki, A.K., Carrillo, N., Karplus, P.A. (Mayo 1998) **Crystal Structures of Wild-type and Mutants of Pea Ferredoxin-NADP⁺ Reductase: a Productive NADP⁺ Binding Mode and its Mechanistic Significance.** The International Symposium on Mechanism of Enzymatic Catalysis. Guilin, China.
11. Rial, D.V., Almará, A., Orellano, E.G., Arakaki, A.K. & Ceccarelli, E.A. (Noviembre 1998) **Análisis de Sitios de Unión de Chaperones Hsp70 en el Péptido Tránsito del Precursor de Ferredoxina-NADP⁺ Reductasa.** XXXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mendoza.
12. Marraffini, L.A., Arakaki, A.K. & Ceccarelli, E.A. (Noviembre 1998) **Rol de Tyr114 en la Estructura y Función de Ferredoxina-NADP⁺ Reductasa.** XXXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mendoza.
13. Rial, D., Arakaki, A.K. & Ceccarelli, E.A. (Noviembre 1999) **Relación Estructura-Función en el Péptido Tránsito del Precursor de Ferredoxina-NADP⁺ Reductasa de Arveja.** XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mendoza.
14. Carrillo, N., Arakaki, A.K., Orellano, E.G., Calcaterra, N., Ottado, J., Karplus, P.A., Deng, Z. & Ceccarelli, E.A. (Noviembre 1999) **Geometría de la Unión de NADP⁺ a Ferredoxina-NADP⁺ Reductasas.** XXXV Reunión Anual de la

Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mendoza.

15. Arakaki, A.K., Rial, D.V. & Ceccarelli, E.A. (Diciembre 1999) **Distribución de los Sitios de Unión para Chaperones Hsp70 en los Péptidos Tránsito de Precusores Cloroplásticos.** XIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Rosario, Santa Fe.
16. Arakaki, A.K., Karplus, D.V., Zanetti, G., Carrillo, N. & Ceccarelli, E.A. (Mayo 2000) **The Carboxyl Terminal Tyrosine Contributes To The Pyridine Nucleotides Affinity And Specificity In Plant Ferredoxin-NADP⁺ Reductase.** XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Caxambú, Brasil.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
1 INTRODUCCIÓN	
1.1 Flavoproteínas	3
1.1.1 La versatilidad de las flavoproteínas	3
1.1.2 Propiedades químicas de las flavín coenzimas	7
1.1.3 Propiedades espectroscópicas de las flavín coenzimas	8
1.2 Ferredoxina-NADP⁺ reductasas plastídicas	10
1.2.1 Descubrimiento de la enzima y su caracterización inicial	10
1.2.2 Distribución y funciones en los organismos vivos	12
1.2.3 Síntesis y transporte del precursor de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa plastídica	14
1.2.4 Estructura terciaria de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa plastídica	15
1.2.5 Ferredoxina-NADP ⁺ reductasa plastídica: prototipo de una familia estructural	18
1.2.5.1 Familia ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	18
1.2.5.2 Superfamilia ferredoxina-NADP ⁺ reductasa en la clasificación SCOP de dominios proteicos	20
1.2.5.3 Ferredoxina-NADP ⁺ reductasas que no pertenecen a la superfamilia	24
1.2.6 Interacción de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa con su grupo prostético FAD	27
1.2.6.1 Interacciones polares con el grupo prostético	27
1.2.6.2 Interacciones π - π con el grupo prostético	29
1.2.7 Interacción de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa con el sustrato NADP ⁺	32
1.2.7.1 Interacciones con la porción adenosina 2',5'-difosfato	32
1.2.7.2 Interacciones con la porción nicotinamida	33
1.2.8 Interacción de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa con ferredoxina y flavodoxina	34
1.2.9 Mecanismo catalítico de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	37
1.2.9.1 Los pasos en la vía catalítica	37
1.2.9.2 Residuos que participan activamente en la catálisis	39
1.3 Objetivos del trabajo de Tesis	41

2	MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1	Métodos computacionales	42
2.1.1	Determinación de la distribución de flavoenzimas entre las óxido-reductasas	42
2.1.2	Obtención y alineamiento de secuencias proteicas	43
2.1.3	Construcción de árboles filogenéticos basados en secuencias de proteínas	44
2.1.4	Obtención, procesamiento y representación de estructuras tridimensionales de proteínas	45
2.1.5	Cálculos mecánico-cuánticos	45
2.1.5.1	Parámetros y opciones empleados en los cálculos mecánico-cuánticos	46
2.2	Obtención de diferentes formas de ferredoxina-NADP⁺ reductasa	47
2.2.1	Cepas bacterianas	47
2.2.2	Medios de cultivo	47
2.2.3	Plásmidos utilizados para expresar ferredoxina-NADP ⁺ reductasa en <i>Escherichia coli</i>	47
2.2.4	Transformación de <i>Escherichia coli</i> con ADN plasmídico	48
2.2.5	Condiciones generales aplicadas durante las distintas etapas de las purificaciones proteicas	49
2.2.6	Obtención de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa como producto de fusión con glutatión <i>S</i> -transferasa (GST-FNR)	49
2.2.6.1	Preparación de los extractos celulares	49
2.2.6.2	Purificación de GST-FNR mediante cromatografía de afinidad	50
2.2.7	Digestión de GST-FNR con endoproteasa Xa y purificación a homogeneidad de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	51
2.2.8	Obtención de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa libre de NADP ⁺	52
2.2.9	Electroforesis de proteínas	53
2.2.10	Determinación de la concentración de proteínas	53
2.2.11	Transferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa ("Western blot")	54

2.3	Técnicas aplicadas a ferredoxina-NADP⁺ reductasa pura	55
2.3.1	Determinación de actividad diaforasa	55
2.3.2	Determinación de parámetros cinéticos	55
2.3.3	Extracción y dosaje de FAD proveniente de GST-FNR	56
2.3.4	Proteólisis controlada de GST-FNR	56
2.3.5	Análisis espectroscópicos de absorción electrónica	56
2.3.6	Determinación de las constantes de disociación de los complejos entre distintas variantes de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa y piridín nucleótidos	57
2.3.7	Determinación de las estructuras tridimensionales de distintas variantes de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa.	58
2.3.7.1	Cristalización y adquisición de los datos de difracción	58
2.3.7.2	Determinación y refinamiento de las estructuras cristalográficas	59
2.3.7.3	Coordenadas cristalográficas	61

RESULTADOS

3	ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS FERREDOXINA-NADP⁺ REDUCTASAS TIPO PLASTÍDICAS	
3.1	Introducción	62
3.2	Resultados	63
3.2.1	Filogenia de ferredoxina-NADP ⁺ reductasas plastídicas	63
3.2.2	Subtipos de ferredoxina-NADP ⁺ reductasas proteobacterianas	68
3.2.3	Filogenia de ferredoxina-NADP ⁺ reductasas proteobacterianas	73
3.3	Discusión	75
4	PARTICIPACIÓN DEL RESIDUO Y89 EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE FERREDOXINA-NADP⁺ REDUCTASA DE ARVEJA	
4.1	Introducción	80
4.2	Resultados	81
4.2.1	Contenidos de FAD en mutantes de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa en el residuo Y89 fusionadas a glutatión S-transferasa	81

4.2.2	Proteólisis limitada con termolisina de mutantes de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa en el residuo Y89 fusionadas a glutatión <i>S</i> -transferasa	84
4.2.3	Espectros de absorción electrónica de mutantes de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa en el residuo Y89	86
4.2.4	Interacción de mutantes de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa en el residuo Y89 con NADP ⁺	88
4.2.5	Parámetros cinéticos de la actividad diaforasa dependiente de NADPH de mutantes de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa en el residuo Y89	90
4.3	Discusión	93
5	PARTICIPACIÓN DEL RESIDUO Y308 EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE FERREDOXINA-NADP⁺ REDUCTASA DE ARVEJA	
5.1	Introducción	108
5.2	Resultados	111
5.2.1	Espectros de absorción electrónica de mutantes de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa en el residuo Y308	111
5.2.2	Estructuras cristalográficas de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa de arveja	113
5.2.2.1	Estructura de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa silvestre	113
5.2.2.2	Estructura del complejo FNR Y308S/NADP ⁺	114
5.2.2.3	Estructura del complejo FNR Y308S/NADPH	118
5.2.2.4	Estructura del complejo FNR Y308W/NADP ⁺	119
5.2.3	Interacción de mutantes de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa en el residuo Y308 con piridín nucleótidos	121
5.2.4	Especificidad para piridín nucleótidos de mutantes de ferredoxina-NADP ⁺ reductasa en el residuo Y308	127
5.3	Discusión	128
5.3.1	Unión bipartita de NADP ⁺ a ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	128
5.3.2	Anatomía del sitio activo	130
5.3.3	Modulación de la especificidad NADPH/NADH por el residuo tirosina carboxilo terminal	131

6	MODELIZACIÓN DEL ENTORNO AROMÁTICO DE LA ISOALOXAZINA EN LA FERREDOXINA-NADP⁺ REDUCTASA	
6.1	Introducción	136
6.2	Resultados	139
6.2.1	Interacciones π - π entre aminoácidos aromáticos y la isoaloxazina en la ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	139
6.2.2	Curvas de energía potencial asociadas a la rotación de la cadena lateral de los residuos aromáticos cercanos a la isoaloxazina	146
6.3	Discusión	151
7	CONCLUSIONES GENERALES	156
8	RESUMEN	159
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNasa: desoxirribonucleasa

AMP: adenosina 5', fosfato

ADP: adenosina 5', difosfato

ATP: adenosina 5', trifosfato

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato p-toluidina

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

DEAE: dietilaminoetil

DTT: ditioneitol

EC: Enzyme Commission, prefijo para el código numérico de nomenclatura de enzimas

E. coli: Escherichia coli

EDTA: etilen amino tetraacetato

FAD: flavín adenín dinucleótido

FMN: flavín mononucleótido

Fd: ferredoxina

Fld: flavodoxina

FNR: ferredoxina-NADP⁺ reductasa

FPR: ferredoxina-NADP⁺ reductasa de proteobacterias, o flavodoxina-NADP⁺ reductasa

GR: glutatión reductasa

GST: glutatión S-transferasa

HOMO: orbital molecular ocupado de mayor energía

IgG: inmunoglobulina G

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactósido

k_{cat} : constante catalítica

K_d : constante de disociación

k_{esp} : constante de especificidad

kDa: kilo Dalton

K_m : constante de Michaelis

LUMO: orbital molecular no ocupado de menor energía

MOPS: 4-morfolino propano sulfónico

NAD^+ : nicotinamín adenín dinucleótido

NADH: nicotinamín adenín dinucleótido reducido

NADP^+ : nicotinamín adenín dinucleótido fosfato

NADPH: nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido

NBT: azul de nitro tetrazolio

NMN: nicotinamín mononucleótido

PM: peso molecular

PMSF: fenil -metil -sulfonil -fluoruro

preFNR: precursor de ferredoxina- NADP^+ reductasa

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato de sodio

TCA: ácido tricloro acético

Tris: tris-hidroximetil-amino metano

Convención para nombrar una proteína mutante: XnY

n: posición del residuo sustituido en la estructura primaria.

X: residuo aminoacídico de la proteína silvestre en posición n.

Y: residuo aminoacídico de la proteína mutante en posición n.

1 INTRODUCCIÓN

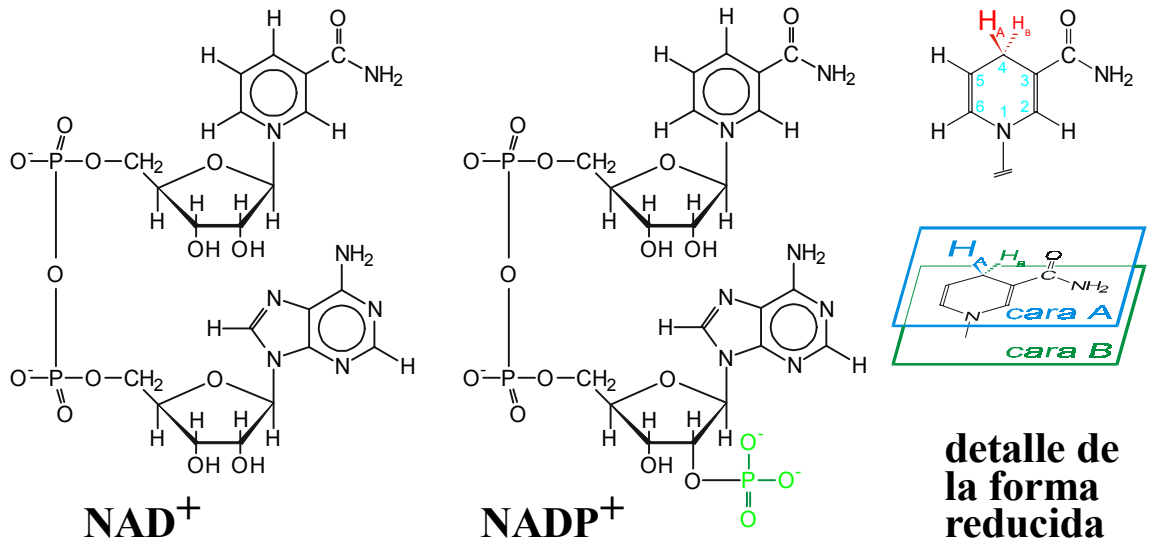
1.1 Flavoproteínas

1.1.1 La versatilidad de las flavoproteínas

Los cofactores extienden la química de las enzimas, permitiendo el curso de reacciones que no podrían catalizarse explotando únicamente las propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos. Éstos pueden ser compuestos inorgánicos iónicos (generalmente cationes metálicos) o moléculas orgánicas llamadas coenzimas. Las coenzimas que participan en reacciones de óxido-reducción poseen estructuras y potenciales redox adecuados para la transferencia de electrones o de átomos de hidrógeno (**Figura 1.1.A**). Los piridín nucleótidos, como el NAD^+ y el NADP^+ , en general son fácilmente dissociables de las proteínas, y funcionan como transportadores de átomos de hidrógeno. En cambio, las flavín coenzimas como el FAD o el FMN (**Figura 1.1.B**), interaccionan de forma muy estrecha con las proteínas, o establecen enlaces covalentes con las mismas (1). Cuando una coenzima se encuentra unida muy fuertemente a la proteína, recibe el nombre de grupo prostético. Si bien el FAD, el FMN y la riboflavina son las flavín coenzimas más comunes, también se han descrito un número de flavinas modificadas, tales como el 8-hidroxi-FAD, o el 6-hidroxi-FAD que tienen propiedades fisicoquímicas particulares (2).

Las flavoproteínas son polipéptidos que poseen derivados de flavina firmemente unidos y participan en un amplio espectro de procesos de óxido-reducción (2). La gran mayoría de las flavoproteínas descritas hasta la fecha son enzimas, también llamadas flavoenzimas. Asimismo, casi todas las flavoenzimas son óxido-reductasas, según la clasificación establecida por el Comité de Nomenclatura de la Unión de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB). En la nomenclatura EC de

A. Piridín nucleótidos



B. Flavín nucleótidos

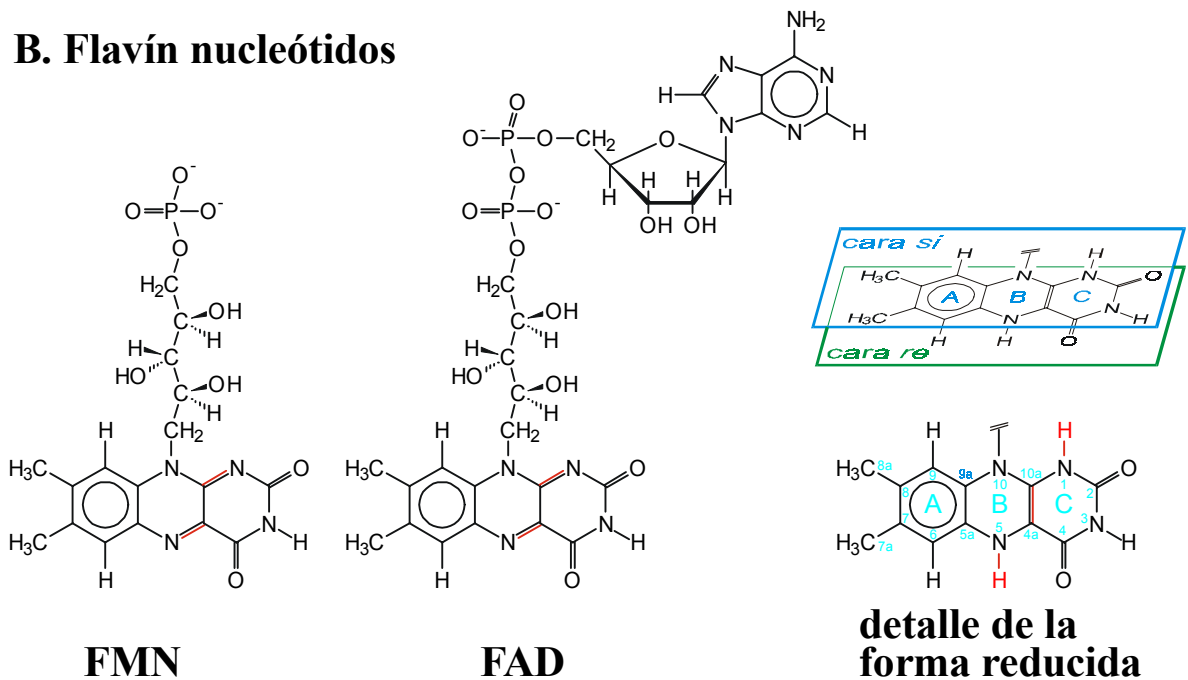


Figura 1.1. Principales coenzimas que participan en reacciones de óxido-reducción. Los planos azul y verde indican la convención que define las caras de la coenzima. **A**, Piridín nucleótidos: estructura de las coenzimas oxidadas y detalle de la porción nicotinamida en su forma reducida. Se indica en verde el grupo 2' fosfato que distingue el NADP⁺ del NAD⁺, en celeste la numeración estándar para los átomos del anillo de nicotinamida, y en rojo la nomenclatura de los átomos de hidrógeno del carbono 4 del mismo anillo. **B**, Flavín nucleótidos: estructura de las coenzimas oxidadas y detalle de la porción isoaloxazina en su forma reducida. Se indica en celeste la numeración estándar para los átomos de la isoaloxazina y la nomenclatura de los tres anillos que la componen, y en rojo las diferencias entre las formas oxidada y reducida.

cuatro números, el primer número indica una de las siguientes clases (clases de nivel 1 ó clases_{N1}): 1: óxido-reductasas, 2: transferasas, 3: hidrolasas, 4: liasas, 5: isomerasas y 6: ligasas. En la clase_{N1} EC 1 u óxido-reductasas, el segundo número (clase_{N2}) indica la naturaleza del dador de electrones y el tercer número (clase_{N3}) especifica el aceptor de electrones. En todos los casos, el cuarto número (clase_{N4}) sólo implica un orden correlativo dentro de una especificación de clases_{N1,N2,N3}. Las óxido-reductasas representan una de las clases_{N1} de enzimas más abundante, y son de extrema importancia en el metabolismo de cualquier organismo vivo. En la base de datos ENZYME versión 25.0 de julio de 1999 con actualización al 15 de enero de 2000 (3), se contabilizan 3389 enzimas distintas, de las cuáles 897 pertenecen a la clase_{N1} de las óxido-reductasas, constituyendo un 26,5 % del total.

Más del 95 % de las flavoenzimas conocidas han sido clasificadas como óxido-reductasas. Con el fin de representar la distribución de las flavoenzimas entre las óxido-reductasas se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva como se describe en la sección 2.1.1 de Materiales y Métodos, cuyo resultado puede apreciarse en la **Figura 1.2**. Se han resaltado en la figura las 50 clases_{1,N2,N3} que poseen entre sus integrantes al menos una enzima con un flavín nucleótido como grupo prostético, de un total de 82 clases_{1,N2,N3} de óxido-reductasas. Estas flavoenzimas participan en una extensa gama de reacciones, tan diversas como la deshidrogenación de D-aminoácidos, la activación del dioxígeno o la emisión de luz (2). En síntesis, las flavoenzimas son capaces de catalizar el 61 % (50/82) de los diferentes tipos de reacciones de óxido-reducción conocidos, exhibiendo una versatilidad inusual en las enzimas dependientes de otros cofactores (2).

Las escasas flavoproteínas que no son enzimas pueden dividirse en dos grandes grupos. Uno de ellos está formado por transportadores de electrones como las flavodoxinas (4) y las ETF o "electron transferring flavoprotein" (5) que participan en

Enzimas de clase_{N1} EC 1 óxido-reductasas

m
n

m: cantidad de clases_{N4} con al menos una flavoenzima
n: cantidad total de clases_{N4}

CLASE _{N2} [DADOR]		CLASE _{N3} [ACEPTOR]																				
		no definido	NAD ⁺ o NADP ⁺	citocromo	oxígeno	quinona o similar	disulfuro	compuesto nitrogenado	dinitrógeno	proteína Fe-S	flavina	+ 2 oxíg.	2-oxoglutarato, + 1 oxíg. a c/dador	+ 1 oxíg.	NADH o NADPH, + 2 oxíg. a un dador	NADH o NADPH, + 1 oxíg.	flavina o flavopr. reducida, + 1 oxíg.	proteína Fe-S reducida, + 1 oxíg.	pteridina reducida, + 1 oxíg.	ascorbato reducido, + 1 oxíg.	otros compuestos, + 1 oxíg.	otros aceptores
		1	1	2	3	4	5	6	6	7	8	11	11	12	12	13	14	15	16	17	18	99
grupo CH-OH	1	.	$\frac{2}{245}$	$\frac{2}{4}$	$\frac{24}{36}$	$\frac{0}{2}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{11}{27}$
grupo aldehído u oxo	2	.	$\frac{4}{54}$	$\frac{2}{4}$	$\frac{7}{10}$	$\frac{1}{3}$.	.	.	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{5}$
grupo CH-CH	3	.	$\frac{9}{54}$	$\frac{0}{1}$	$\frac{5}{8}$.	$\frac{1}{1}$.	.	$\frac{0}{1}$	$\frac{14}{19}$
grupo CH-NH ₂	4	.	$\frac{2}{19}$	$\frac{0}{1}$	$\frac{13}{15}$	$\frac{0}{2}$.	.	.	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{4}$
grupo CH-NH	5	.	$\frac{2}{26}$.	$\frac{7}{10}$	$\frac{0}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{5}{10}$
NADH o NADPH	6	.	$\frac{1}{2}$	$\frac{4}{4}$.	$\frac{5}{9}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{6}{12}$.	.	$\frac{0}{2}$	$\frac{7}{11}$
otros comp. nitrogenados	7	.	.	$\frac{0}{1}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{0}{2}$	$\frac{4}{6}$
grupo azufrado	8	.	$\frac{2}{3}$	$\frac{0}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{0}{7}$	$\frac{0}{1}$.	.	$\frac{0}{1}$	$\frac{1}{4}$
grupo hemo	9	.	.	.	$\frac{0}{2}$.	.	$\frac{1}{1}$	$\frac{0}{1}$
difenoles o similares	10	.	$\frac{1}{1}$	$\frac{0}{2}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{1}$
peróxido	11	$\frac{1}{13}$
hidrógeno	12	.	$\frac{1}{1}$	$\frac{0}{1}$	$\frac{2}{4}$
dadores simples, + oxíg.	13	$\frac{3}{43}$.	$\frac{7}{11}$	$\frac{1}{3}$
pares de dadores, + oxíg.	14	$\frac{0}{15}$.	$\frac{10}{14}$	$\frac{34}{66}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{2}{6}$	$\frac{0}{6}$	$\frac{0}{2}$	$\frac{0}{1}$	$\frac{5}{27}$
radical superóxido	15	$\frac{0}{1}$
oxida iones metálicos	16	.	$\frac{1}{2}$.	$\frac{0}{1}$
grupo -CH ₂	17	.	$\frac{0}{1}$.	$\frac{0}{1}$	$\frac{0}{2}$	$\frac{1}{1}$
ferredoxina reducida	18	.	$\frac{3}{4}$	$\frac{0}{1}$	$\frac{0}{1}$
flavodoxina reducida	19	$\frac{0}{1}$
otras óxido-reductasas	97	$\frac{0}{3}$

Figura 1.2. Oxido-reductasas y flavoenzimas. Enzimas de clase_{N1} EC 1 (óxido-reductasas) ordenadas en forma de matriz bidimensional, cada fila representa una clase_{N2} (segundo número EC) y cada columna refiere a una clase_{N3} (tercer número EC). En las descripciones de clases_{N2} y clases_{N3} se indican los grupos o moléculas sobre los cuales actúa la enzima, en azul si es un dador de electrones o en rojo si es un aceptor; comp.: compuesto, flavopr.: flavoproteína, + oxíg.: incorporación de oxígeno molecular, +1 oxíg.: incorporación de 1 átomo de oxígeno, +2 oxíg.: incorporación de 2 átomos de oxígeno, +1 oxíg. a c/dador: incorporación de 1 átomo de oxígeno a cada uno de dos dadores, +2 oxíg. a un dador: incorporación de 2 átomos de oxígeno al mismo dador. Los puntos en la matriz indican un tipo de enzima inexistente, los recuadros con fondo amarillo representan una clase_{1.N2.N3} con al menos una flavoenzima entre sus integrantes y los recuadros con fondo blanco, aquellas clases_{1.N2.N3} que no poseen flavoenzimas entre sus integrantes. El procedimiento seguido para la construcción de la tabla se detalla en la sección 2.1.1 de Materiales y Métodos.

reacciones biológicas de óxido-reducción, aunque no muestran actividad enzimática *per se*. El otro grupo lo constituyen flavoproteínas sensoras, reguladas por factores ambientales que afectan su estado redox, como ser luz, oxígeno o voltaje (6). El dominio que porta el flavín nucleótido se ha denominado LOV, por "Light Oxygen Voltage". Las funciones de las flavoproteínas sensoras con dominios LOV son muy diversas: NIFL es un regulador de la fijación de nitrógeno presente en bacterias (7), AER es un mediador bacteriano de la aerotaxis (8) y NPH1 es un fotorreceptor involucrado en el fototropismo de las plantas superiores (6).

Recientemente se han realizado clasificaciones de las flavoproteínas desde un punto de vista estructural-evolutivo más que funcional (9, 10). Los análisis se basaron en la comparación de las aproximadamente 200 estructuras tridimensionales de flavoproteínas conocidas hasta el presente, identificándose un número reducido de plegamientos diferentes. Estos estudios concluyen que la clasificación estructural de flavoproteínas no muestra correlación con su clasificación funcional, indicando que las interacciones proteína-flavina específicas que gobiernan la reactividad pueden ser variadas en un plegamiento común generando un gran número de actividades diferentes.

1.1.2 Propiedades químicas de las flavín coenzimas

La 7,8-dimetilisoaloxazina es la parte de la molécula de flavina que participa activamente en los procesos de óxido-reducción (**Figura 1.1.B**, detalle de la forma reducida). La reducción de la flavina ocurre reversiblemente en dos pasos de transferencia de un sólo electrón pasando por un estado radicalario o semiquinona, o en un sólo paso de transferencia de dos electrones involucrando cambios que afectan particularmente las posiciones N(1), C(4a) y N(5) del anillo. El potencial medio de esta conversión es aproximadamente -200 mV a pH 7, pero el mismo puede aumentar o disminuir dentro de un rango de 600 mV a través de interacciones con la proteína (2).

La modulación de la reactividad de la flavina puede deberse a efectos sobre la termodinámica o sobre la cinética de una reacción. El núcleo de pirimidina (anillo C) es deficiente en electrones, por lo que, en términos termodinámicos, cualquier interacción que tienda a disminuir su densidad de carga negativa incrementará su potencial redox.

La flavina reducida puede interpretarse como una parte 1,2-diamino-4,5-dimetilbenceno rica en electrones (anillo A), fusionada con un 5,6-diamino-uracilo (anillo C). Esta última parte de la flavina localiza y estabiliza los electrones tomados por la flavina oxidada. El grado de estabilización o desestabilización de la carga negativa constituye un factor importante para gobernar el potencial redox. Así, mientras una carga positiva en la proteína cerca del anillo de pirimidina contribuirá a incrementar el potencial redox, la presencia de una carga negativa o de un ambiente hidrofóbico lo disminuirá (2). Es importante remarcar que las reacciones de la flavina con un sustrato determinado ocurren preferentemente en una posición determinada de la isoaloxazina, específica para cada tipo de reacción. Un impedimento estérico que dificulte el acceso a una posición específica de la flavina, puede impedir el curso de una reacción determinada, sin afectar en absoluto a otra reacción (2).

1.1.3 Propiedades espectroscópicas de las flavín coenzimas

En la **Figura 1.3** están representados los tres estados de oxidación de las flavinas. En cualquiera de ellos, las formas neutras poseen un sistema de orbitales moleculares π basado en 16 orbitales atómicos p, aunque difieren en el número de electrones π que alojan: 18 para la forma oxidada, 19 para la forma radicalaria y 20 para la forma reducida (11). Los distintos estados de oxidación de la flavina le confieren características espectroscópicas particulares que determinan su color: amarillo para la forma completamente oxidada, rojo para el radical catiónico, azul para el radical neutro e incoloro para las formas completamente reducidas. Así, el color amarillo característico

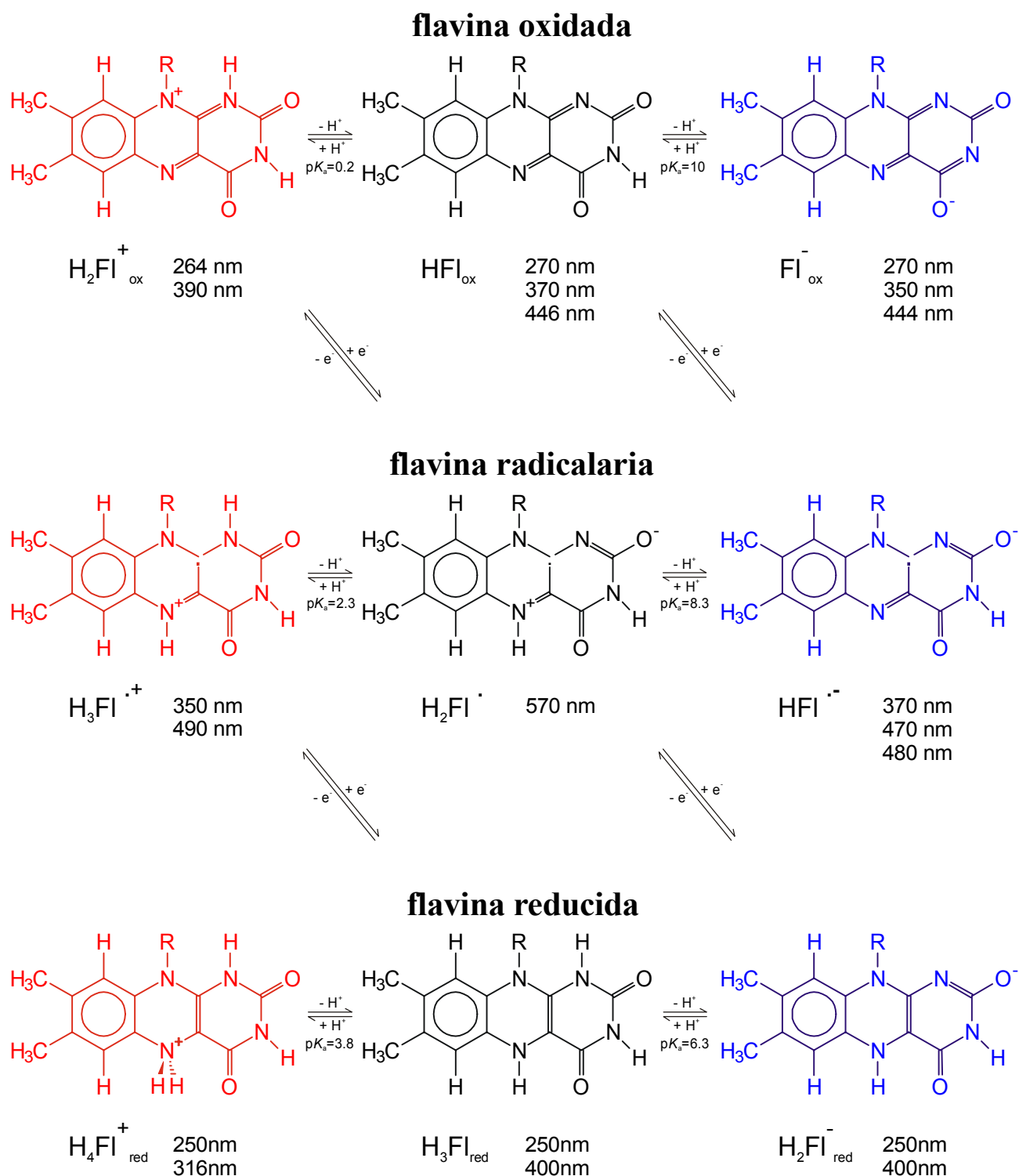


Figura 1.3. Los tres estados de oxidación de las flavinas y los conjugados ácido-base normalmente accesibles en cada nivel de oxidación. En la línea superior se presentan tres conjugados ácido-base de la forma completamente oxidada de la flavina, en la línea media, tres conjugados de la forma radicalaria (semiquinona) y en la línea inferior, tres conjugados de la forma completamente reducida. En cada línea se representa en rojo la forma catiónica, en negro la forma neutra y en azul la forma aniónica. Debajo de cada estructura se detalla la abreviatura correspondiente y las longitudes de onda de los picos de absorción característicos. Adaptado de referencia 11.

de la forma más estable de la mayoría de las flavoproteínas es consecuencia del estado oxidado de la flavín coenzima.

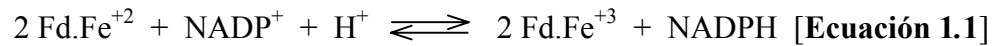
Las flavinas son moléculas fluorescentes, con parámetros espectrales que dependen de las características particulares del ambiente molecular que las rodea, lo que las convierte en grupos reporteros naturales para las flavoproteínas. Aunque la mayoría de los datos de fluorescencia de proteínas son obtenidos utilizando los residuos triptofano como sondas intrínsecas, el uso del grupo prostético como reportero en las flavoproteínas es más ventajoso. La mayoría de las proteínas posee varios residuos triptofano, lo que hace ambigua la interpretación de los resultados a causa de las diferentes contribuciones a la fluorescencia de distintos residuos triptofano, mientras que muy pocas flavoproteínas poseen más de una flavina como grupo prostético. Además, la fotofísica del triptofano es más complicada que la del residuo isoaloxazina de las flavinas naturales. Sin embargo, en la mayoría de los casos la fluorescencia de una flavina unida a una flavoproteína es muy débil comparada con la fluorescencia de la misma flavina libre, lo que exige sistemas de detección sensibles y extremo cuidado para evitar la presencia de flavina libre en una muestra de flavoproteína (12).

1.2 Ferredoxina-NADP⁺ reductasas plastídicas

1.2.1 Descubrimiento de la enzima y su caracterización inicial

En 1956 Avron y Jagendorf (13) describieron por primera vez el aislamiento, a partir de cloroplastos de espinaca, de una “diaforasa TPNH”, es decir, una flavoenzima capaz de transferir electrones hacia y desde NADP(H). La participación de esta flavoproteína en la catálisis del último paso de la cadena fotosintética de transporte de electrones fue claramente establecida en los años siguientes, principalmente a través del trabajo de M. Shin y D. I. Arnon (14). Ellos llamaron a la enzima ferredoxina-NADP⁺ reductasa (EC 1.18.1.2, abreviada FNR) y

demonstraron que su función fisiológica en cloroplastos es mediar la transferencia reversible de electrones entre dos moléculas de ferredoxina, transportador obligado de un electrón, y una molécula de NADP(H):



La **Ecuación 1.1** describe la única reacción de FNR cuya relevancia fisiológica está establecida sobre bases firmes, llevando a la inclusión de esta enzima en la clase funcional de flavoproteínas llamadas deshidrogenasas / electrón transferasas (15). Las FNRs de plantas son capaces de mediar la óxido-reducción de ferredoxinas de diversos orígenes y con diferentes grupos hierro-azufre, así como de flavodoxinas (Fld) que contienen FMN como grupo prostético (16). Las flavodoxinas se sintetizan en bacterias ya sea constitutivamente o como respuesta al crecimiento en condiciones deficientes en hierro. Además de ferredoxinas o flavodoxinas, otros aceptores de electrones pueden participar en la oxidación mediada por FNR de NADPH, de acuerdo a la siguiente ecuación:



en la cual Aox y Ared representan las formas oxidada y reducida del aceptor de electrones, el término n representa uno o dos, dependiendo del comportamiento del oxidante como transportador de un electrón (ferricianuro, citocromos) o de dos electrones (NAD^+ , indofenoles). La ferredoxina es estrictamente necesaria para la reducción *in vitro* del citocromo *c* y también facilita la transferencia de electrones al oxígeno molecular. Estas reacciones consisten en la reducción inicial de ferredoxina como se muestra en la **Ecuación 1.1**, seguida de su rápida reoxidación no enzimática por el aceptor final de electrones. En la **Tabla 1.1** se presenta un resumen de las reacciones catalizadas por FNR.

Tabla 1.1 Diferentes actividades asociadas con ferredoxina-NADP⁺ reductasas^a

Dador de electrones	Aceptor de electrones	Actividad	k _{cat} [s ⁻¹]
Fd	NADP ⁺	ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	500
NADPH	ferricianuro de potasio indofenoles viológenos sales de tetrazolio	diaforasa	100-500 ^b
NADPH	Fd-citocromo <i>c</i>	citocromo <i>c</i> reductasa	50-100
NADPH	NAD ⁺	transhidrogenasa	5-10
NADPH	O ₂ , Fd-O ₂	oxidasa	0,5

^a Datos obtenidos de las referencias 16 a 21.

^b Las constantes catalíticas varían de acuerdo al aceptor electrónico empleado.

1.2.2 Distribución y funciones en los organismos vivos

Luego de la identificación de una FNR cloroplástica, se aislaron flavoproteínas equivalentes a partir de una variedad de tejidos y organismos, tanto fototrofos como heterotrofos. En organismos no fotosintéticos, la reacción descrita por la **Ecuación 1.1** está desplazada hacia la reducción de Fd o Fld, proveyendo electrones para metabolismos tan diversos como la hidroxilación de esteroides en mitocondrias de mamíferos (22), oxidación de metano en bacterias metanotrofas (23), activación reductiva de enzimas biosintéticas en *Escherichia coli* y otros procariotas (24), así como fijación de hidrógeno y nitrógeno en anaerobios (25).

En cloroplastos y cianobacterias, la ferredoxina es reducida por una reacción fotoquímica a nivel del fotosistema I. FNR media la transferencia de electrones desde esta proteína hierro-azufre reducida al NADP⁺, con la consiguiente formación del NADPH necesario para la fijación de CO₂ y otras vías biosintéticas (16). Las

flavodoxinas de cianobacterias son capaces de reemplazar funcionalmente a la ferredoxina durante la fotorreducción del NADP^+ (26).

Además de FNRs cloroplásticas, sistemáticamente se han detectado isoformas de FNR en tejidos no fototróficos de plantas, incluyendo frutos y raíces (27). Las reductasas no fotosintéticas muestran esencialmente las mismas propiedades cinéticas y exhiben determinantes antigénicos en común con su contraparte cloroplástica (27, 28). La presencia de FNR en tejidos de plantas heterótrofos es consistente con la existencia de una vía redox (comprendiendo NADPH, ferredoxina y FNR) que provee equivalentes de reducción a enzimas dependientes de ferredoxina involucradas en el metabolismo de nitrógeno, como ser nitrito reductasa y glutamato sintasa (27, 28). En heterocistos de cianobacterias, una vía similar provee el poder reductor necesario para la fijación de dinitrógeno a través de la nitrogenasa (25).

El aislamiento de clones de FNR a partir de varios tejidos de diversas plantas confirmó que las reductasas cloroplásticas y heterótrofas están codificadas por diferentes unidades de transcripción, y permitió la caracterización de los elementos regulatorios en *cis* para ambos tipos de genes (29, 30). Se cree que las células de plantas son absolutamente dependientes de ferredoxina y FNR, aún en ausencia de cloroplastos. La flavoproteína cloroplástica (y las FNRs de células vegetativas de cianobacterias) son únicas en el sentido que, bajo condiciones fisiológicas, ellas conducen la reacción de la **Ecuación 1.1** hacia la reducción de NADP^+ , mientras que las enzimas presentes en plástidos no fotosintéticos siguen la tendencia general de la familia de la reductasa: la generación de ferredoxina reducida para una plétora de vías metabólicas.

Es ahora claro que además de sus funciones específicas en los diferentes organismos y tipos celulares, las FNRs pueden jugar un papel crítico en la defensa celular concertada contra el daño oxidativo. La reductasa de *Escherichia coli* se induce

específicamente por radicales superóxido. La inactivación de esta flavoenzima genera bacterias altamente sensibles a los compuestos propagadores de radicales (31). La complementación de estas células mutantes con un gen de FNR de plantas restablece la tolerancia oxidativa a los niveles de la cepa silvestre, indicando que la reductasa se comporta como un detoxificador de radicales dañinos en el huésped bacteriano (32, 33). Todavía no se ha demostrado una función análoga en las FNRs de eucariotas.

1.2.3 Síntesis y transporte del precursor de ferredoxina-NADP⁺ reductasa plastídica

La FNR cloroplástica es de codificación nuclear y es sintetizada en ribosomas citosólicos libres como un precursor (preFNR), conteniendo una extensión amino terminal de ~ 5 kDa (34). Esta extensión, llamada péptido tránsito, permite a la proteína precursora ser dirigida y translocada a través de la envoltura plastídica. Durante o inmediatamente después de la importación, el péptido tránsito es cortado por una proteasa del estroma (34) y la proteína madura se une a la cara externa de la membrana tilacoidal a través de una proteína de 17 kDa (20, 35).

El desarrollo de sistemas para la expresión de FNR madura y precursor de FNR, tanto en *Escherichia coli* (36, 37) como en *Saccharomyces cerevisiae* (38), permitió la caracterización del proceso de importación de esta proteína a cloroplastos. Se comprobó que el precursor de FNR posee características estructurales similares a las de la proteína madura, contiene FAD firmemente unido (21) y es enzimáticamente activo (39). El precursor pudo ser purificado e importado a cloroplastos aislados en una forma dependiente de ATP y estimulada por agregado de extractos de hojas, produciéndose su procesamiento a la forma madura de la enzima (21). Posteriormente se determinaron los parámetros cinéticos del proceso de importación (40) y se comprobó que la unión a la envoltura cloroplástica no es suficiente para provocar el

despliegue del precursor (39). Aunque es aceptado que preFNR debe desplegarse durante el transporte a través de la membrana, hasta el momento no se han elucidado los mecanismos de ensamble de la enzima, ni de incorporación de su grupo prostético dentro del plástido.

1.2.4 Estructura terciaria de ferredoxina-NADP⁺ reductasa

Las FNRs de plantas son proteínas hidrofílicas de aproximadamente 35 kDa, que contienen una molécula de FAD no covalentemente unido por molécula de apoproteína (14, 41). Se han determinado (o deducido de secuencia de nucleótidos) las secuencias de aminoácidos de FNRs provenientes de plantas, algas y cianobacterias (30, 34, 42-57). Para aquellas reductasas que se encuentran en organismos fotosintéticos se ha propuesto la denominación de FNRs tipo planta o plastídicas (58). Las estructuras primarias de las FNRs plastídicas se encuentran moderadamente conservadas a lo largo de toda la secuencia, exceptuando los péptidos tránsito que son mucho más variables, y ciertas regiones que interaccionan con el FAD y el NADP(H), que muestran un alto grado de conservación (58). Las FNRs de cianobacterias contienen una extensión amino terminal adicional, de aproximadamente 10 kDa, cuya secuencia está relacionada a los péptidos de unión a ficobiliproteína (45, 47). Este dominio extra no parece participar en la actividad enzimática, y muy probablemente se pliega independientemente de los dominios reconocidos en las reductasas plastídicas (47).

Se conocen las estructuras tridimensionales de FNRs plastídicas provenientes de hoja de espinaca (41, 59) y de la cianobacteria *Anabaena* PCC7119 (60). Las mismas fueron determinadas independientemente y resultaron muy similares, confirmando que la estructura de la enzima se encuentra altamente conservada entre los organismos fotosintéticos. La flavoproteína está formada por un dominio amino terminal para la unión del grupo prostético FAD y otro carboxilo terminal para la unión

del sustrato NADP^+ (**Figura 1.4.A**). Cada uno de los dominios contiene aproximadamente 150 aminoácidos, aunque los primeros aminoácidos del extremo amino terminal no son visibles en los mapas de densidad electrónica por encontrarse desordenados. En la **Figura 1.4.B** puede apreciarse un diagrama topológico de ambos dominios estructurales. El dominio amino terminal es un barril de dos láminas β conformado por seis cadenas antiparalelas, una hélice α y un giro mantenido por una pequeña lámina β de dos cadenas antiparalelas (41, 60). El dominio carboxilo terminal es un arreglo de cinco cadenas β paralelas rodeadas por hélices α (41, 60), constituyendo una variante del típico plegamiento de Rossmann para unión de dinucleótidos (61, 62). Cada dominio es una estructura compacta que une la mayor parte de su nucleótido respectivo, aunque ambos cofactores también interactúan con algunos residuos del otro dominio (**Figura 1.4.C**). Una gran hendidura entre ambos dominios permite la unión de ferredoxina, mientras que una cavidad hidrofóbica de 200 \AA^3 localizada en el dominio carboxilo terminal, cerca de la superficie de la proteína y distante del sitio activo, estaría involucrada en la unión a la membrana tilacoidal (59, 60). Recientemente se ha determinado la estructura cristalográfica de FNR plastídica proveniente de raíces de maíz, aunque ésta aún no ha sido depositada en bases de datos. El plegamiento resulta muy similar al de FNR de hoja de espinaca, siendo la principal característica distintiva el establecimiento de un puente disulfuro en el dominio amino terminal de la enzima (63).

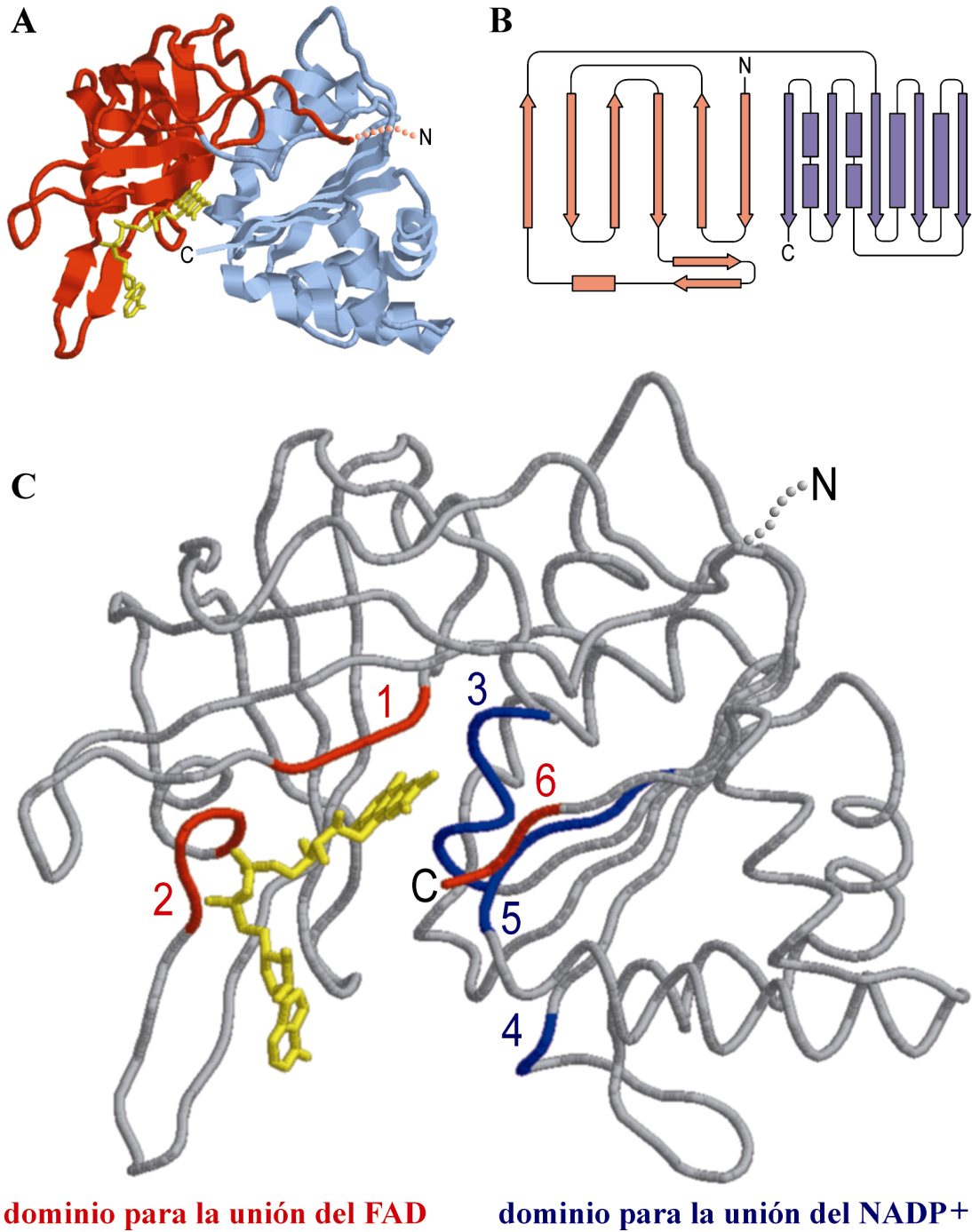


Figura 1.4. Estructura terciaria de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa de *Spinacia oleracea* (59). Las líneas de puntos representan los primeros 18 residuos de FNR, que no son visibles en el mapa de densidad electrónica (59). El extremo amino terminal se indica con N y el carboxilo terminal con C. El FAD se representa en color amarillo. Los números sobre regiones coloreadas señalan las seis regiones conservadas que definen a la familia FNR. **A**, Diagrama de cintas representando los dominios para unión de FAD (rojo) y de NADP⁺ (celeste). **B**, Diagrama topológico de FNR; rectángulos: hélices α , flechas: cadenas β , rojo: dominio del FAD, azul: dominio del NADP⁺. **C**, Representación de los C α de FNR, mostrando las regiones conservadas que interaccionan con el FAD (rojo) o con el NADP⁺ (azul).

1.2.5 Ferredoxina-NADP⁺ reductasa plastídica: prototipo de una familia estructural

1.2.5.1 Familia ferredoxina-NADP⁺ reductasa

Las FNRs plastídicas constituyen el prototipo de una estructura de dos dominios que se encuentra en muchas óxido-reductasas flavín dependientes que transfieren electrones de uno en uno, desde piridín nucleótidos hacia aceptores de un electrón. En un principio esta gran familia de flavoproteínas fue definida por la presencia ordenada a lo largo de la cadena polipeptídica, de seis grupos de residuos altamente conservados que interaccionan con el flavín o el piridín nucleótido (41, 64, **Figura 1.5**). En la familia FNR se han incluido diversas proteínas, como ser la óxido nítrico sintasa, la citocromo P450 reductasa, la sulfito reductasa, la NADPH oxidasa de neutrófilos, la flavohemoglobina, la citocromo b5 reductasa, la nitrato reductasa y la ftalato dioxigenasa reductasa. Todas ellas poseen dos dominios tipo FNR, uno para la unión de FAD o FMN y el otro para la unión de NAD(H) o NADP(H). Además, algunas tienen dominios extra que posibilitan la interaccionan con membranas, la fijación de centros hierro azufre o de grupos hemo (65). Según este esquema, los miembros de la familia que contienen FAD se distinguen de aquellos que contienen FMN por la secuencia consenso que define al segmento 2. Asimismo, la secuencia consenso que caracteriza al segmento 4 permite diferenciar los miembros NADP(H) dependientes de aquellos NAD(H) dependientes (64). Como se observa en el alineamiento de secuencias de la **Figura 1.5**, las FNRs plastídicas muestran una gran conservación en estas regiones.

En proteobacterias, la ferredoxina-NADP⁺ reductasa se denomina FPR o flavodoxina-NADP⁺ reductasa (24). Las FPRs muestran una baja identidad de secuencia

	1	2	3	4	5	6
Consenso	Rx ^{YS} _{FT}	Gxx ^S _T	GTGIxP	SR	YxCGP	E ^x F
Plantas (hoja)	93	130	171	234	270	312
<i>Spinacia oleracea</i>	RLYS	GVCS	GTGIAP	SR	YMCGL	EVY
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
<i>Glycine max</i>
<i>Zea mays</i> (1)
<i>Zea mays</i> (2)
<i>Oryza sativa</i>
<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Capsicum annuum</i>
<i>Vicia faba</i>
<i>Pisum sativum</i>
Plantas (raíz)						
<i>Zea mays</i>V..	..	.F...	...
<i>Oryza sativa</i> (1)I..	...V..	..	.F...	...
<i>Oryza sativa</i> (2)V..	..	.F...	...
<i>Arabidopsis thaliana</i> (1)V..	..	.F...	...
<i>Arabidopsis thaliana</i> (2)V..	..	.F...	...
<i>Pisum sativum</i>V..	..	.F...	...
<i>Nicotiana tabacum</i>	...LV..	..	.F...	...
Algas						
<i>Cyanophora paradoxa</i>T.
<i>Volvox carteri</i>I..F...	...
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>L..F...	...
Cianobacterias						
<i>Synechococcus</i> sp.
<i>Synechocystis</i> sp.T.
<i>Spirulina</i> sp.I...	.T.
<i>Anabaena</i> sp.I...	.T.
Proteobacterias						
<i>Escherichia coli</i>	.A..	.KL.	..A.G.	..	ML..N	.H.
<i>Azotobacter vinelandii</i>	.A..	.PLT	...L..	T.	MI..S	.RA

Figura 1.5. Secuencias conservadas que caracterizan a la gran familia FNR. Se indica la ubicación de los segmentos peptídicos en un esquema a escala de la secuencia primaria de FNR de espinaca (*Spinacia oleracea*). La secuencia consenso del segmento 2 corresponde a proteínas con FAD, y la del segmento 4 a aquellas dependientes de NADP(H). En negrita: residuo absolutamente conservado, x: cualquier residuo aminoacídico. En el alineamiento de FNRs, se indica con un número sobre el primer aminoácido de cada segmento la posición relativa en la secuencia de la FNR madura de espinaca que tiene un total de 314 residuos (43). Los números de acceso de las secuencias se detallan en las **Figuras 3.1** y **3.3**.

con las FNRs plásticas, pero se ajustan al consenso definido para la familia FNR (**Figura 1.5**). El análisis de las dos estructuras tridimensionales de flavodoxina-NADP⁺ reductasas elucidadas hasta el momento, FPR de *Escherichia coli* (66) y FPR de *Azotobacter vinelandii* (67), corrobora la inclusión de las FPRs en esta familia. Como se observa en la **Figura 1.6**, una particularidad de estas estructuras es el inusual plegamiento sobre sí mismo que adopta el FAD, una conformación que sólo se ha encontrado en la ADN fotoliasa (68). Esta flavoenzima es responsable de la reparación de los dímeros de piridina en el ADN (69). Una transferencia de electrones inducida por luz reduce al FAD, llevando al grupo prostético a un estado competente para la catálisis (70). Se cree que el plegamiento en U mantiene al FAD presente en la fotoliasa en estado reducido, pero no se conoce cual sería la función de esta conformación en las FPRs.

Debe destacarse que la definición de la familia FNR se basó en la comparación de la estructura tridimensional de la FNR de *Spinacia oleracea* con alineamientos de secuencia primaria de óxido-reductasas similares, ya que no se disponía de estructuras tridimensionales de las mismas (41). Posteriormente, con el conocimiento de la estructura cristalográfica de la ftalato dioxigenasa reductasa de *Pseudomonas cepacia* (71), se refinaron los consensos de secuencia para los seis segmentos conservados (64). Con seguridad, el análisis comparativo de estas estructuras con las estructuras de varios miembros de la familia FNR elucidadas posteriormente, obligará a realizar una revisión de estos consensos.

1.2.5.2 Superfamilia ferredoxina-NADP⁺ reductasa en la clasificación SCOP de dominios proteicos

En enero del año 2000, la principal base de datos estructural (PDB o Protein Data Bank) ya superaba las 10⁴ estructuras tridimensionales de proteínas (72). La

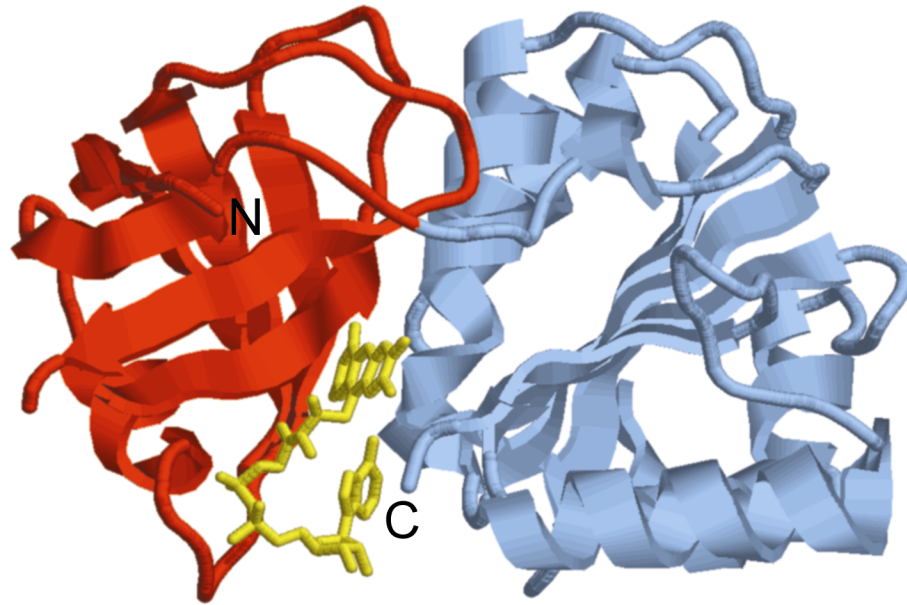
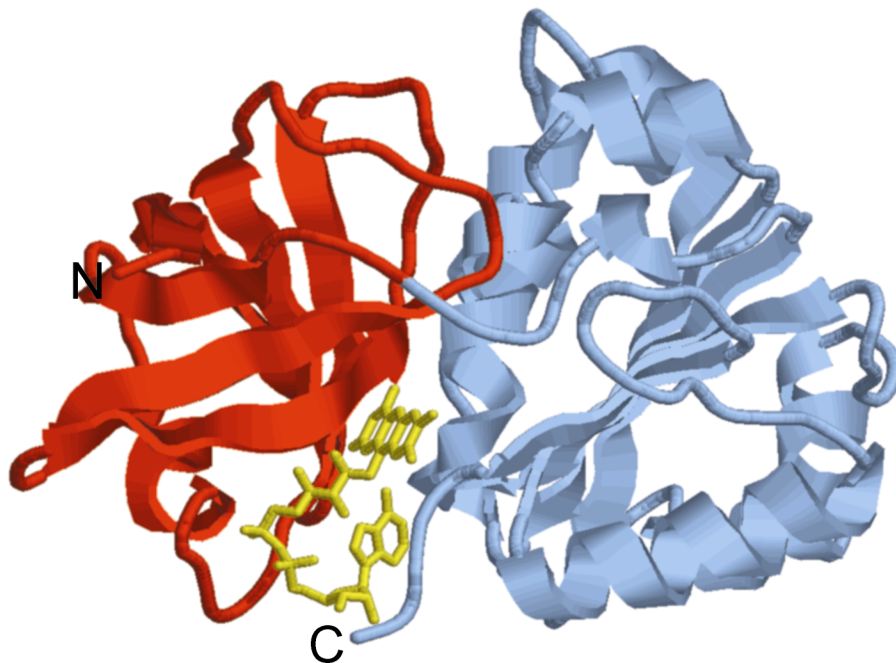
A. FPR de *Escherichia coli***B. FPR de *Azotobacter vinelandii***

Figura 1.6. Estructura terciaria de las flavodoxina-NADP⁺ reductasas de proteobacterias. Diagrama de cintas representando los dominios para unión de FAD (rojo) y de NADP⁺ (celeste). El FAD se representa en color amarillo. Los extremos amino y carboxilo terminal se indican con N y C, respectivamente. **A**, FPR de *Escherichia coli* (66). **B**, FPR de *Azotobacter vinelandii* (67).

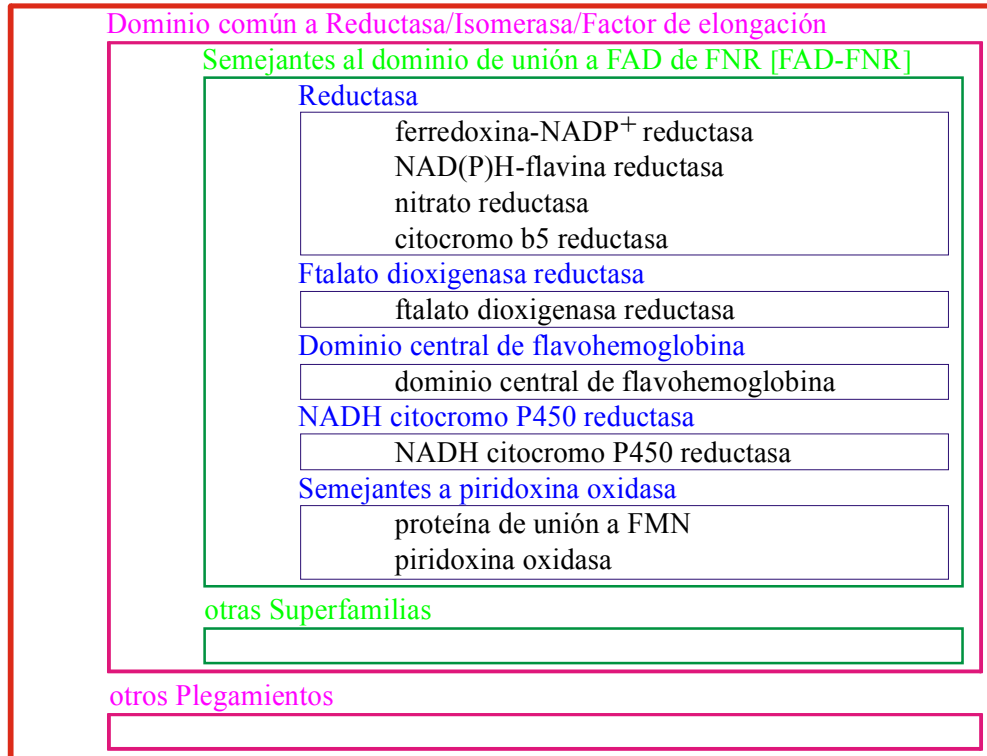
disponibilidad de esta gran cantidad de datos, junto al desarrollo de algoritmos que permiten la detección de proteínas estructuralmente relacionadas, ha permitido establecer nuevos sistemas de clasificación. Uno de los esquemas que ha ganado más aceptación es la clasificación SCOP (**S**tructural **C**lassification **O**f **P**roteins) que provee una descripción detallada de las interrelaciones estructurales y evolutivas entre todos los dominios de proteínas cuya estructura es conocida (73). Los diferentes niveles en la jerarquía de SCOP son: clase, plegamiento, superfamilia, familia y dominio. La "clase" hace referencia principalmente al tipo de estructura secundaria predominante en el dominio. Así, la clase *sólo beta* incluye dominios proteicos compuestos mayoritariamente por láminas beta. El nivel estructural "plegamiento" agrupa dominios con elementos de estructura secundaria similares y arreglados según la misma topología. Los dominios con baja identidad de secuencia, pero con un probable origen evolutivo en común a juzgar por sus características estructurales y funcionales, son ubicados en la misma "superfamilia". En cambio, los dominios claramente relacionados desde el punto de vista evolutivo se agrupan en la misma "familia".

En la clasificación SCOP los dominios para unión de flavín y de piridín nucleótidos de FNR son prototipos de la superfamilias FAD-FNR y NADP-FNR, respectivamente (**Figura 1.7**). Ambas superfamilias incluyen a las familias reductasa, ftalato dioxigenasa reductasa, flavohemoglobina y NADH citocromo P450 reductasa. En la superfamilia FAD-FNR, además de las recién mencionadas, se agrega la familia compuesta por los dominios semejantes a la piridoxina oxidasa. Los miembros de la familia piridoxina oxidasa provienen de proteínas que no poseen un dominio para unión de piridín nucleótido, lo que explica la ausencia de esta familia en la superfamilia NADP-FNR.

CLASE



sólo Beta



Alfa/Beta

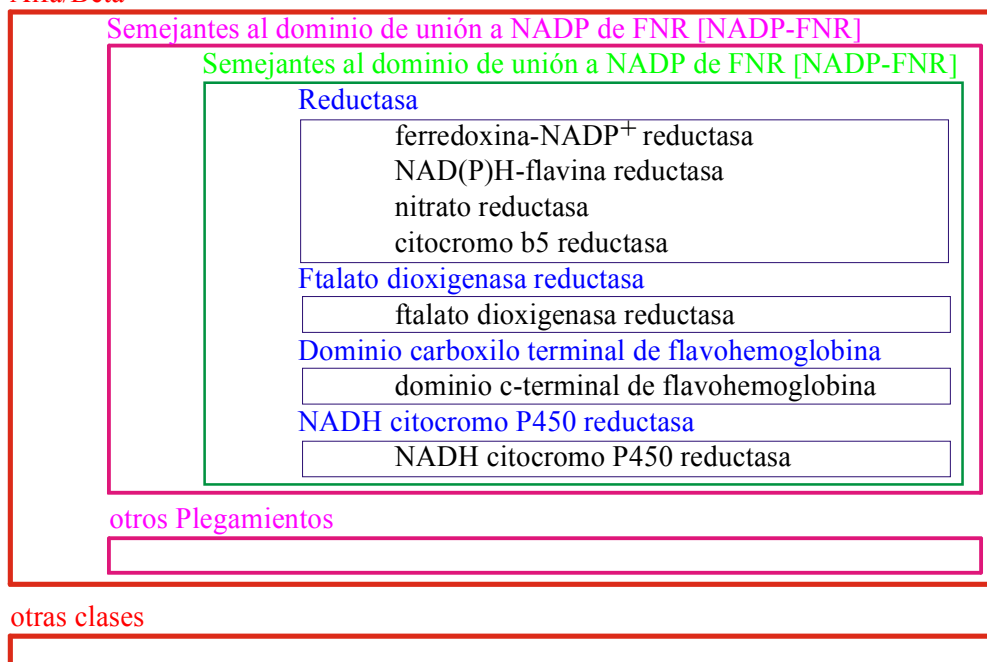


Figura 1.7. Miembros de la superfamilia estructural de proteínas relacionadas a FNR.

En la **Tabla 1.2** se detallan todas las estructuras tridimensionales asociadas a los miembros de la superfamilia FNR. Dado que varias de las enzimas listadas poseen otros dominios además de los del tipo FNR, en la tabla sólo se indica el grupo prostético del dominio tipo FAD-FNR y el sustrato piridín nucleótido del dominio tipo NADP-FNR. En la **Figura 1.8** se muestra una comparación de los dominios tipo FNR de ferredoxina-NADP⁺ reductasa (59), flavodoxina-NADP⁺ reductasa (66), NAD(P)H-flavina reductasa clase I (74), nitrato reductasa (75), citocromo b5 reductasa (76), ftalato dioxigenasa reductasa (71), flavohemoglobina (77) y citocromo P450 reductasa (78).

La inclusión de la NAD(P)H-flavina reductasa clase I en la superfamilia FNR merece especial atención. Esta enzima cataliza la reducción de derivados de flavina libres (riboflavina, FAD y especialmente FMN), en presencia de NAD(P)H (79). La proteína no posee un derivado de flavina como grupo prostético, sino que lo emplea como sustrato, por lo tanto no es una verdadera flavoproteína. Sin embargo, análisis estructurales (80) y funcionales (81) permiten afirmar que se trata de un auténtico miembro de la superfamilia.

1.2.5.3 Ferredoxina-NADP⁺ reductasas que no pertenecen a la superfamilia

En la biosíntesis de hormonas esteroideas se encuentra involucrada una ferredoxina-NADP⁺ reductasa que transfiere electrones del NADPH a una ferredoxina específica llamada adrenodoxina (22). A nivel de estructura primaria, las adrenodoxina reductasas no están relacionadas con las FNRs plastídicas, ni con las FPRs. Recientemente, gracias a la obtención de la estructura cristalográfica de la adrenodoxina reductasa de *Bos taurus* (82), se ha comprobado que la misma tampoco posee homología estructural con los miembros de la superfamilia FNR. Esto indicaría que ambos grupos han tenido orígenes independientes, y han seguido un proceso de

Tabla 1.2. Miembros de la superfamilia FNR y sus estructuras tridimensionales. Las estructuras corresponden al estado oxidado de la enzima silvestre, con excepción de aquella cuyo identificador es 1FNC. PDB ID: identificador en la base PDB, Gr.pr.: grupo prostético, Sustrato pir.nuc.: sólo se indica el sustrato tipo piridín nucleótido, Res.: resolución, mut.: mutante, n.a.: no aplicable por ser estructuras de resonancia magnética nuclear, FNR: ferredoxina-NADP⁺ reductasa, FPR: flavodoxina-NADP⁺ reductasa, FRE: NAD(P)H-flavina reductasa (la flecha indica que el FMN es sustrato y no grupo prostético de esta enzima), NR: nitrato reductasa, CB5R: citocromo b5 reductasa, PDR: ftalato dioxigenasa reductasa, FLH: flavohemoglobina, CP450R: citocromo P450 reductasa, FMNBP: proteína de unión a FMN, PNPOX: piridoxina 5'-fosfato oxidasa, *S. oleracea*: *Spinacia oleracea*, *A. PCC 7119*: *Anabaena PCC7119*, *E. coli*: *Escherichia coli*, *A. vinelandii*: *Azotobacter vinelandii*, *Z. mays*: *Zea mays*, *S. crofa*: *Sus crofa*, *P. cepacia*: *Pseudomonas cepacia*, *A. eutrophus*: *Alcaligenes eutrophus*, *R. norvegicus*: *Rattus norvegicus*, *S. cerevisiae*: *Sacharomyces cerevisiae*.

PDB ID	Prot.	Gr. pr.	Sustrato pir.nuc.	Especie	Res. [Å]	Comentarios
1FNB	FNR	FAD	NADP ⁺	<i>S. oleracea</i>	1.70	
1FNC	FNR	FAD	NADP ⁺	<i>S. oleracea</i>	1.70	2'-P-AMP, FADH2
1FND	FNR	FAD	NADP ⁺	<i>S. oleracea</i>	1.70	2'-P-AMP
1FRN	FNR	FAD	NADP ⁺	<i>S. oleracea</i>	2.00	mut. S96V
1BX0	FNR	FAD	NADP ⁺	<i>S. oleracea</i>	1.90	mut. E312L
1BX1	FNR	FAD	NADP ⁺	<i>S. oleracea</i>	1.90	mut. E312Q
1FRQ	FNR	FAD	NADP ⁺	<i>S. oleracea</i>	1.95	mut. E312A
1QUE	FNR	FAD	NADP ⁺	<i>A. PCC 7119</i>	1.80	
1QUF	FNR	FAD	NADP ⁺	<i>A. PCC 7119</i>	2.25	NADP ⁺
1BJK	FNR	FAD	NADP ⁺	<i>A. PCC 7119</i>	2.30	mut. R264E
1B2R	FNR	FAD	NADP ⁺	<i>A. PCC 7119</i>	1.80	mut. E301A
1FDR	FPR	FAD	NADP ⁺	<i>E. coli</i>	1.70	
1A8P	FPR	FAD	NADP ⁺	<i>A. vinelandii</i>	2.00	
1QFJ	FRE	FMN→	NAD(P) ⁺	<i>E. coli</i>	2.20	
2CND	NR	FAD	NAD ⁺	<i>Z. mays</i>	2.50	
1CNE	NR	FAD	NAD ⁺	<i>Z. mays</i>	3.00	mut. C242S
1CNF	NR	FAD	NAD ⁺	<i>Z. mays</i>	2.70	ADP, mut. C242S
1NDH	CB5R	FAD	NAD ⁺	<i>S. crofa</i>	2.10	
2PIA	PDR	FMN	NAD ⁺	<i>P. cepacia</i>	2.00	
1CQX	FLH	FAD	NAD ⁺	<i>A. eutrophus</i>	1.75	
1AMO	CP450R	FAD	NADP ⁺	<i>R. norvegicus</i>	2.60	
1AXJ	FMNBP	FMN		<i>E. coli</i>	n.a.	
1CIO	PNPOX	FMN		<i>S. cerevisiae</i>	2.70	

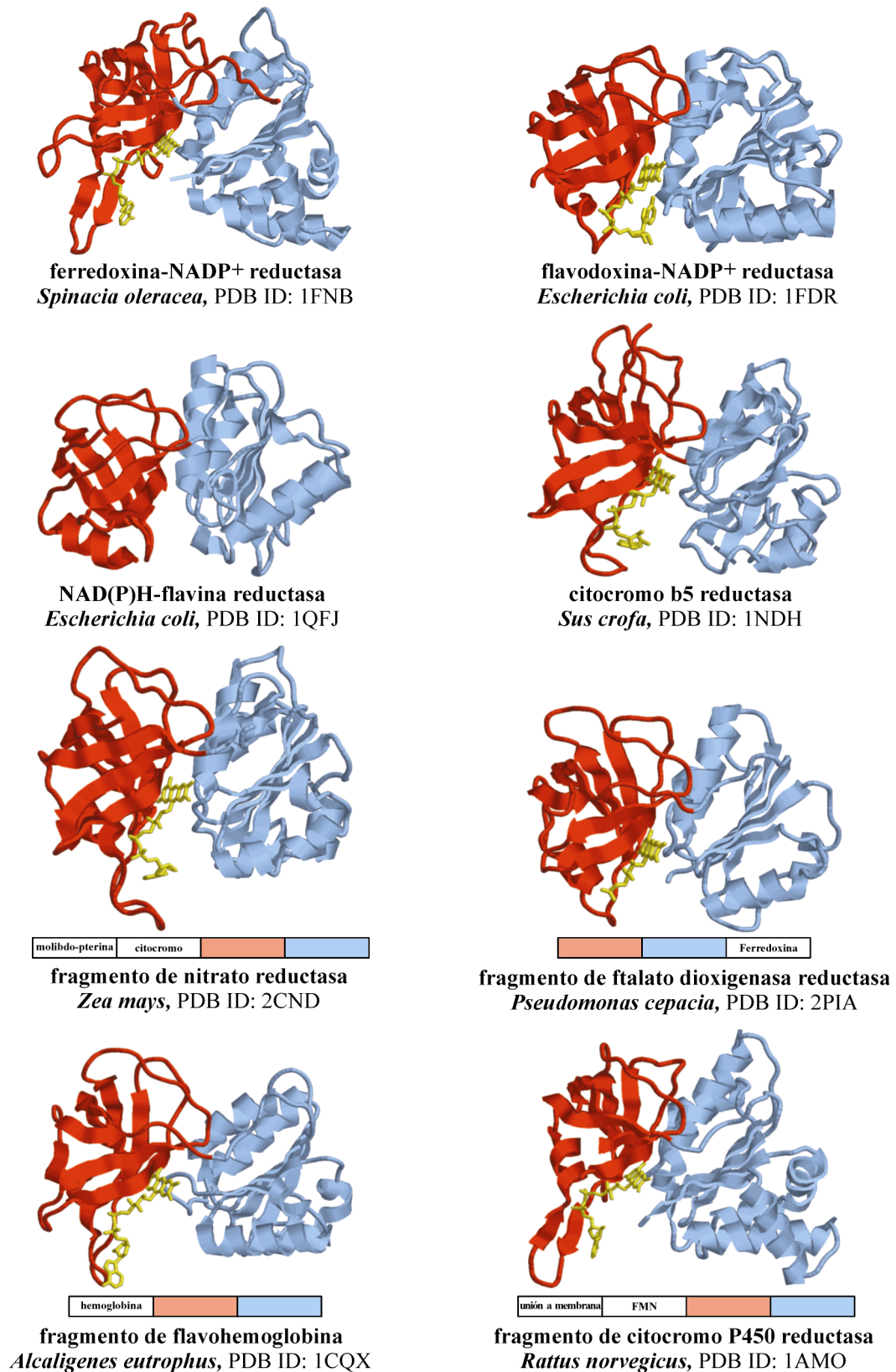


Figura 1.8. Diagrama de cintas de las proteínas de la superfamilia estructural FNR. Se representan en rojo los dominios para unión de FMN o FAD y en azul los dominios para unión de NAD⁺ o NADP⁺. Para las proteínas que los poseen, se presenta un esquema lineal indicando la naturaleza y ubicación de los dominios, incluyendo aquellos que no son del tipo FNR, no mostrados en los diagramas de cintas.

evolución convergente que finalmente produjo proteínas con propiedades enzimáticas esencialmente idénticas.

1.2.6 Interacción de ferredoxina-NADP⁺ reductasa con su grupo prostético FAD

1.2.6.1 Interacciones polares con el grupo prostético

Las estructuras tridimensionales de la FNR de *Spinacia olearacea* (41, 59) y de *Anabena* PCC 7119 (60) son prácticamente idénticas. La principal diferencia radica en una pequeña hélice α adicional en la estructura de la enzima de *Anabaena*, que abarca los residuos Asp172-Ala177. En la **Figura 1.9** se muestra un alineamiento estructural de las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas, y de la secuencia de FNR de *Pisum sativum*, que posee más del 90 % de identidad con la FNR de *Spinacia olearacea*. Todos los residuos que interaccionan con el FAD o con el NADP⁺ son idénticos en las tres enzimas, excepto dos sustituciones conservativas: arginina en vez de lisina en las posiciones 100 y 233 de la FNR de *Anabaena*.

El grupo prostético FAD está unido en una conformación extendida, con la parte flavina insertada en la región interdominio, y la parte adenosina completamente expuesta (**Figura 1.4.C**). El grupo pirofosfato está estabilizado mediante puentes de hidrógeno formados con Arg93/77, Val131/116, Cys132/117 y Ser133/118 (numeración de *Spinacia olearacea* / *Anabena* PCC7119). Los grupos hidroxilo de la parte ribitilo forman puentes de hidrógeno con los residuos Leu94/78 y Tyr95/79, y la parte flavina con los residuos Ser96/80, Cys114/98 y Lys116/Arg100. Los residuos Tyr120/104, Thr172/157 y Tyr314/303 interaccionan indirectamente con el FAD a través de moléculas de agua estructurada (41, 59, 60).

Introducción

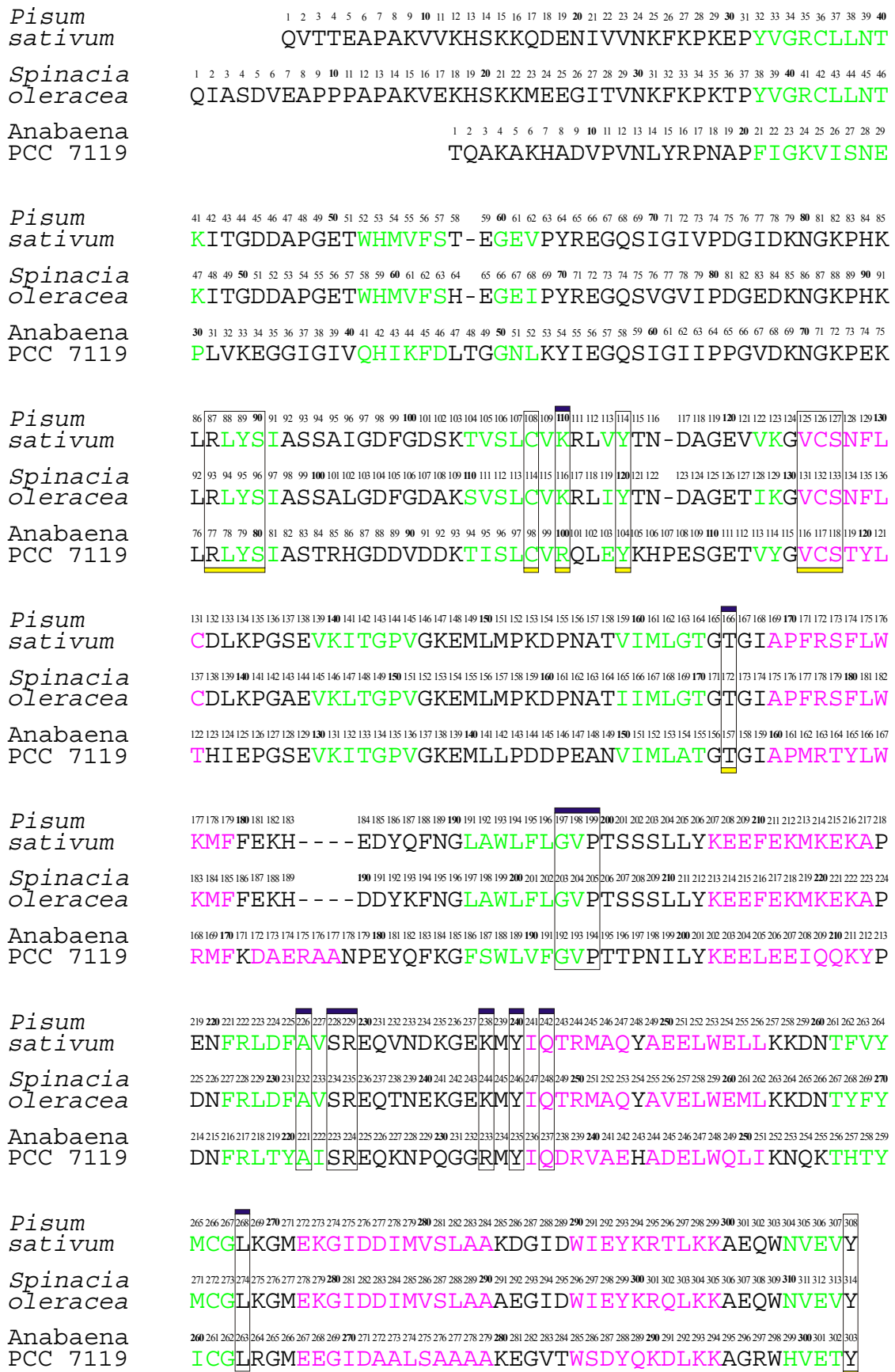


Figura 1.9. Alineamiento estructural de tres FNRs. En verde: cadenas β , en magenta: hélices α , recuadrados con borde inferior amarillo: interacción con FAD, recuadrados con borde superior azul: interacción con la porción 2',5'-difosfato del NADP⁺.

1.2.6.2 Interacciones π – π con el grupo prostético

Además de los numerosos enlaces puente de hidrógeno mencionados, se han descrito interacciones de naturaleza no polar entre el FAD y las cadenas laterales de tres tirosinas. En la **Figura 1.10** se muestra la disposición de estos residuos aromáticos respecto a la molécula de FAD en la FNR de *Spinacia oleracea*. Como puede observarse en la **Tabla 1.3**, la geometría de las tres tirosinas es similar en la FNR de *Anabaena* FNR PCC 7119. La cadena lateral de Tyr120/104 interacciona con la parte adenina del FAD, mientras que las cadenas laterales de Tyr95/79 y Tyr314/303 emparedan a la parte flavina del grupo prostético.

Tabla 1.3 Geometría de las interacciones no polares entre tirosinas y FAD en FNR

Parte de la molécula de FAD que participa de la interacción	Especie			
	<i>Spinacia oleracea</i> ^a		<i>Anabaena</i> PCC 7119 ^b	
	residuo	ángulo ^c	residuo	ángulo
cara <i>si</i> de la flavina	Y95	57°	Y79	62°
adenina	Y120	10°	Y104	13°
cara <i>re</i> de la flavina	Y314	1°	Y303	6°

^a Datos obtenidos de la estructura cristalográfica: 1FNB (59).

^b Datos obtenidos de la estructura cristalográfica: 1QUE (60).

^c Angulo diedro entre el plano que contiene la cadena lateral del residuo y el plano definido por la parte de la molécula de FAD especificada.

En todos los miembros de la superfamilia FNR cuya estructura tridimensional es conocida, se encuentra un residuo aromático cercano a la cara *si* de la flavina. La cadena lateral de este residuo, homólogo estructural de Tyr95/79 en FNR, forma un ángulo diedro con la isoaloxazina que varía desde 0° para la Y178 de la

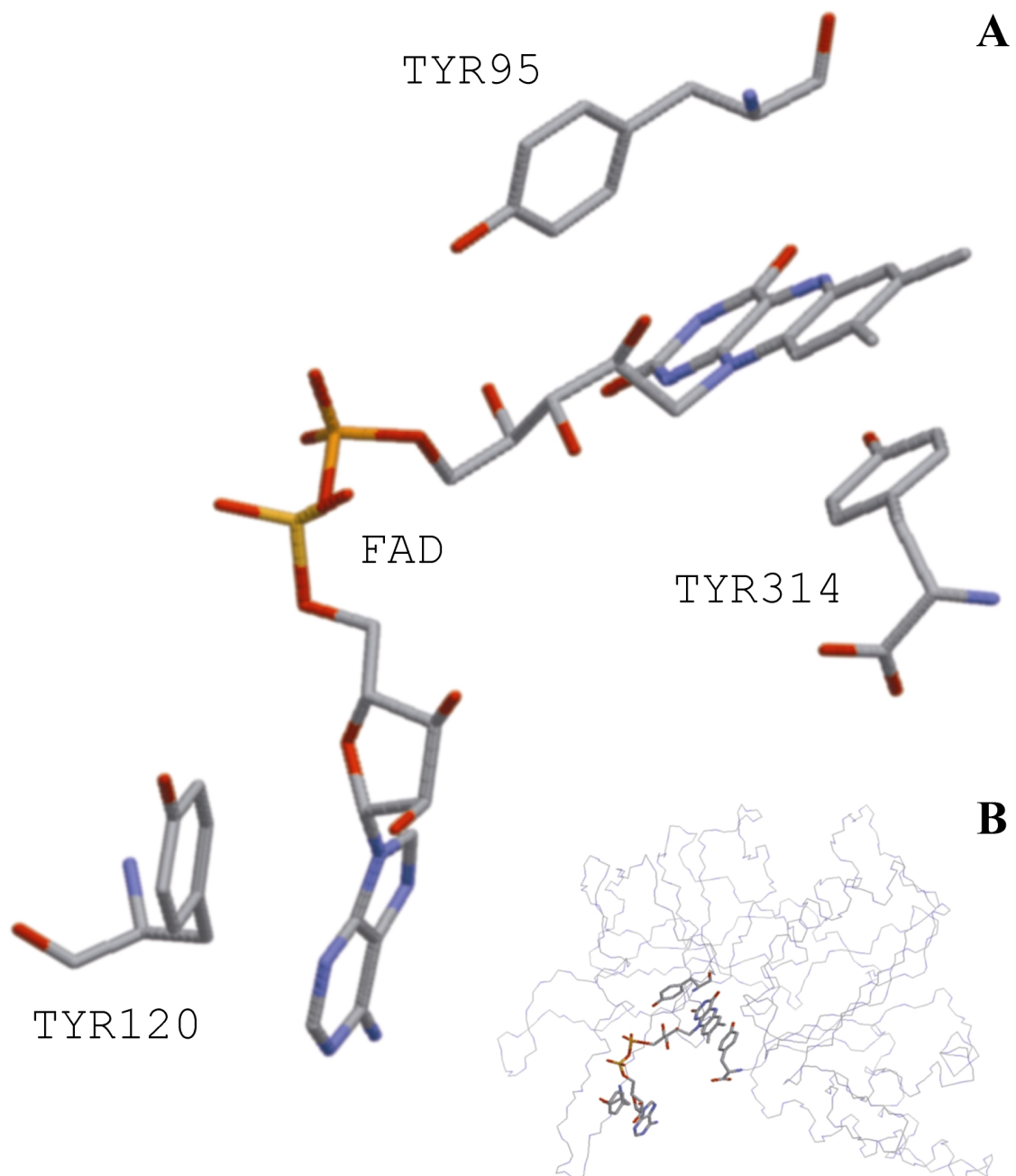


Figura 1.10. Interacciones no polares entre tirosinas y FAD en FNR de *Spinacia oleracea*. **A**, Disposición espacial de los tres residuos que interaccionan en forma no polar con el FAD: tirosinas 95, 120 y 314 (gris: carbono, azul: nitrógeno, rojo: oxígeno, amarillo: fósforo). **B**, Disposición del FAD y las tres tirosinas en un esquema del esqueleto peptídico de FNR de *Spinacia oleracea*.

NADPH citocromo P450 (78), hasta 88° para la Y57 de la ftalato dioxigenasa reductasa (71). Asimismo, los miembros que poseen FAD, con excepción de la flavohemoglobina, presentan un residuo aromático contra la parte adenina del grupo prostético, homólogo a Tyr120/104. Otros miembros de esta superfamilia como la FPR de *Escherichia coli* (66), la ftalato dioxigenasa reductasa (71) y la citocromo P450 reductasa (78), también presentan un residuo aromático contra la cara *re* de la flavina. Las cadenas laterales de estos residuos se ubican casi coplanares a la isoaloxazina, en una disposición semejante a la de Y314/303 en FNR (**Figura 1.10, Tabla 1.3**).

Estos residuos participan de un tipo específico de interacción llamada interacción aromática o interacción π - π (83). Esta interacción atractiva entre sistemas con electrones π deslocalizados puede darse cuando los participantes se encuentran a una distancia medida entre los centroides de los anillos de 3,4 Å a 6 Å (84-86). A pesar de numerosas investigaciones, la contribución de las interacciones π - π al mantenimiento de la estructura y la función de las proteínas aún no es del todo comprendida. La disposición en la cual los sistemas π se ubican aproximadamente coplanares y a una distancia aproximada de 3,5 Å se conoce como apilamiento de orbitales π . Cuando los anillos aromáticos de un apilamiento de orbitales π se encuentran enfrentados cara a cara, la repulsión de los electrones π no favorece el arreglo apilado. En estos casos el sistema se estabiliza por complementariedad de cargas o polarizaciones que llevan a interacciones electrostáticas atractivas entre ambos anillos (84). La geometría que adopta el residuo Y314/303 de FNR respecto a la flavina, es un caso típico de apilamiento de orbitales π .

1.2.7 Interacción de ferredoxina-NADP⁺ reductasa con el sustrato NADP⁺

1.2.7.1 Interacciones con la porción adenosina 2',5'-difosfato

Estudios basados en espectroscopía diferencial sugieren que la transferencia de electrones desde la ferredoxina reducida al NADP⁺ tiene lugar mediante la formación de un complejo ternario entre FNR y sus dos sustratos, indicando que los sitios para la unión de ferredoxina y NADP⁺ son diferentes (87-90). Empleando diversos nucleótidos y aplicando la misma técnica espectroscópica, se determinó que la adenosina 2'-fosfato es la porción del NADP⁺ mínima necesaria para la formación de un complejo 1:1 con FNR, y que un 5'-fosfato en el nucleótido incrementa apreciablemente la estabilidad de la unión (91). El complejo de FNR con adenosina 2',5'-difosfato (2'-P-AMP), mostró la mínima constante de disociación, incluso menor que la del complejo con NADP⁺. Como puede apreciarse en la **Figura 1.1**, la adenosina 2',5'-difosfato constituye la porción estructural o de anclaje de la molécula de NADP⁺, mientras que la porción nicotinamida 5'-fosfato (NMN) es la parte que participa activamente en la óxido-reducción. Además de los resultados mencionados, el análogo 2'-P-AMP compitió con el NADP⁺ en la formación de complejos con la flavoproteína, e inhibió la actividad NADPH diaforasa de la enzima (91). Esto sugiere que ambos nucleótidos interaccionan con el mismo sitio, y permite inferir las interacciones de una porción del NADP⁺ con la proteína, a partir del estudio de complejos 2'-P-AMP/FNR.

Diversos estudios basados en modificación química, marcación de aminoácidos con reactivos específicos o mutagénesis sitio dirigida de FNR de *Spinacia oleracea* o de *Anabaena* PCC 7119, han sugerido la participación en la unión de NADP⁺ de los residuos básicos Lys116/Arg100, Arg235/224 y Lys244/Arg233 (92-98). Los estudios cristalográficos de complejos FNR/NADP⁺ y FNR/2'-P-AMP han confirmado la contribución de estos aminoácidos básicos, y han señalado la importancia

de otros residuos en la interacción de la enzima con el piridín nucleótido (41, 59, 60). En la **Figura 1.9** pueden apreciarse los residuos relevantes de FNR para la unión de la porción adenosina 2',5'-difosfato del sustrato. Los residuos Ser234/223, Arg235/224, Lys244/Arg233 y Tyr246/235 interaccionan a través de puentes de hidrógeno con el 2'-fosfato, y se les atribuye la capacidad de discriminación entre NADP^+ y NAD^+ (64). Los residuos Lys116/Arg100 y Thr172/157 forman puentes de hidrógeno con el pirofosfato, y la porción ribosa hace contactos polares con Ala232/221, Val204/193 y Gln 248/237. Este último residuo también interacciona en forma polar con la porción adenina. El nucleótido hace contactos no polares con los residuos Gly203/192, Val204/193, Pro205/194, Leu274/263 y Tyr246/235. El residuo Tyr246/235 forma un apilamiento de orbitales π con la adenina del nucleótido.

1.2.7.2 Interacciones con la porción nicotinamida

A pesar de numerosos experimentos con una amplia variedad de enzimas, la forma en que la porción activa del sustrato NADP^+ se une a los miembros de la superfamilia FNR no ha podido ser establecida. En estudios cristalográficos de FNR de *Spinacia oleracea* acomplejada con NADP^+ , la porción nicotinamida del dinucleótido no resultó visible, y sólo se obtuvo información relevante de la porción 2'-P-AMP (41, 59). En un estudio similar con FNR de *Anabena* PCC 7119, la nicotinamida se encontró demasiado alejada de la flavina, en una posición que no resultaría fisiológicamente relevante (60).

Las únicas estructuras conocidas de flavoenzimas con NADP^+ unido en forma productiva no provienen de proteínas de la superfamilia FNR. En una forma de unión del NADP^+ observada en la glutatión reductasa (99, 100) y en su homólogo estructural NADH peroxidasa (101), la nicotinamida forma un apilamiento de orbitales π con la isoaloxazina, ubicándose el átomo C4 del NADP^+ adyacente al átomo N5 de la

flavina. En cambio en la estructura de la quinona reductasa, aunque la nicotinamida se encuentra coplanar con la flavina, no se superpone al anillo central de la isoaloxazina (102).

Ante la ausencia de evidencias experimentales, se ha propuesto una hipótesis acerca del modo de unión de la porción nicotinamida del NADP^+ en FNR (41). El modelo se basa en una analogía con las estructuras conocidas de complejos entre piridín nucleótidos y flavoproteínas (99-101), y es consistente con la estructura del complejo entre FNR y 2'-P-AMP. En la **Figura 1.11** se presenta la geometría propuesta entre la nicotinamida y la flavina. La yuxtaposición del átomo C4 de la nicotinamida con el N5 de la flavina es esencial, teniendo en cuenta el mecanismo de transferencia de hidruro aceptado para FNR (103). De intervenir estados radicalarios durante la catálisis, la superposición de orbitales π no sería un requerimiento tan estricto (2). La geometría propuesta, con la cara A de la nicotinamida enfrentada a la cara *re* de la flavina, respeta la estereoquímica demostrada para la transferencia del hidruro (104). En este modelo, el anillo de nicotinamida ocuparía el mismo lugar que el anillo fenólico de Tyr314/303 en la estructura de FNR sin ligando. Por ese motivo, la unión de NADP^+ debería involucrar un reordenamiento estructural, en el que la cadena lateral de la tirosina carboxilo terminal se movería para dar cabida al anillo funcional del piridín nucleótido.

1.2.8 Interacción de ferredoxina- NADP^+ reductasa con ferredoxina y flavodoxina

La FNR de *Spinacia oleracea* es capaz de formar un complejo de gran afinidad con ferredoxina (105, 106). Se han empleado diversas técnicas experimentales para demostrar la importancia de fuerzas electrostáticas en la estabilización de este complejo (107). La FNR de *Anabaena* PCC 7119 forma complejos con ferredoxina (90) y con flavodoxina (108), y se ha demostrado que ambos transportadores de electrones se

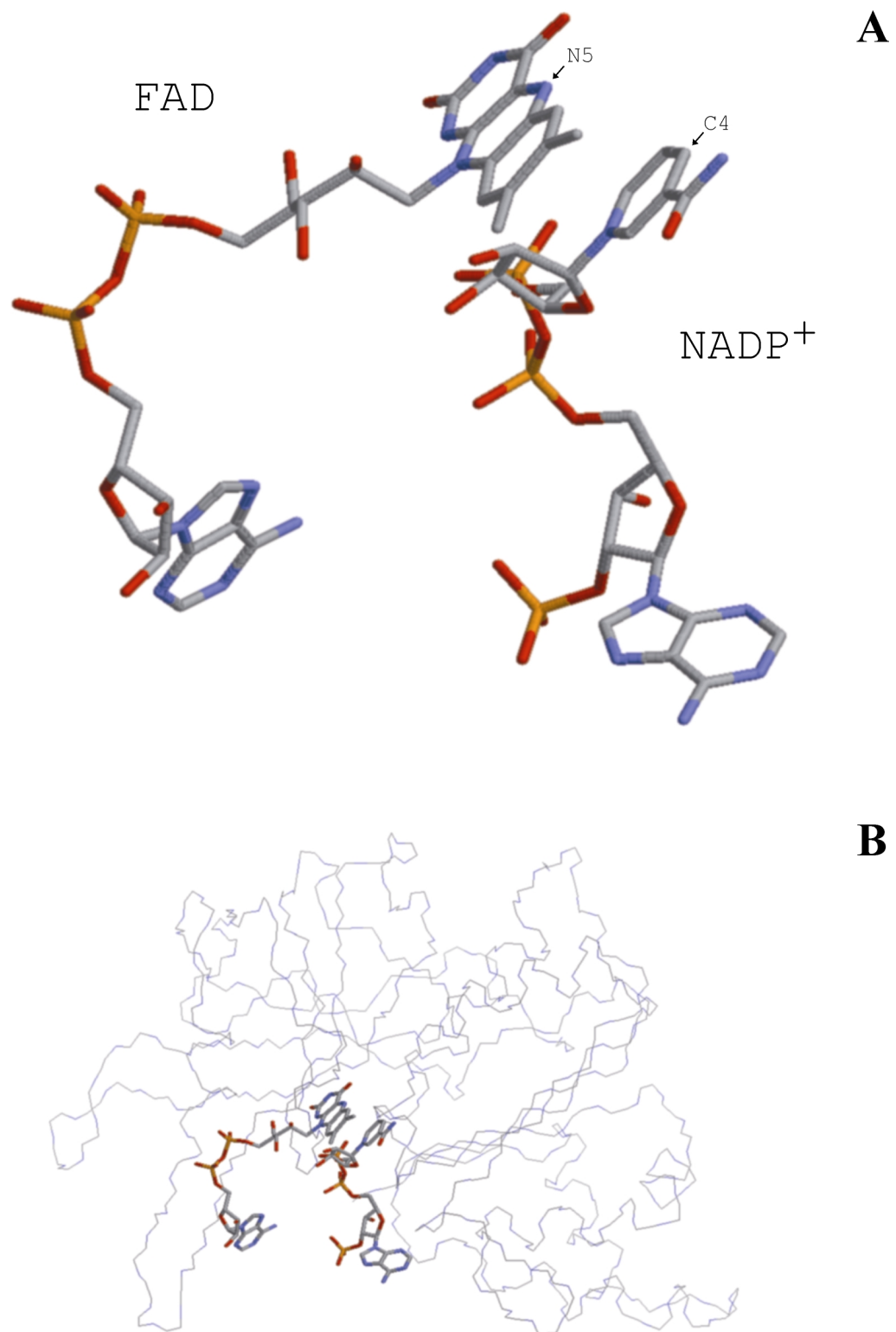


Figura 1.11. Modelo propuesto para la interacción entre la porción nicotinamida del NADP⁺ y la porción flavina del FAD en la ferredoxina-NADP⁺ reductasa. **A**, Detalle del FAD y el NADP⁺. **B**, Disposición del FAD y el NADP⁺ en un esquema del esqueleto peptídico de FNR de *Spinacia oleracea*.

unen en forma similar y en el mismo sitio de la FNR (26, 109, 110). Sin embargo, en el caso de la FNR cianobacteriana, se cree que fuerzas de tipo no polar también contribuyen a la estabilidad del complejo (107). Las interacciones electrostáticas entre las proteínas de plantas son dominantes para la formación y estabilización de un complejo colisional inicial que ya está optimizado para la transferencia de electrones. En cambio, en cianobacterianas estas interacciones sólo llevan a una orientación aproximadamente correcta, que luego es afinada para la formación de un complejo óptimo a través de fuerzas no electrostáticas (107).

El complejo FNR/Fd unido covalentemente mediante entrecruzamiento químico con carbodiimidas solubles en agua, permitió el estudio de un sistema más estable que el intermediario cinético transitorio (111). La proteína quimérica así formada resultó ser un modelo válido del complejo no covalente *in vivo* según numerosos criterios, incluyendo la eficiencia catalítica, posibilitando la identificación inicial de varios residuos aminoácidos involucrados en la interacción proteína proteína (111). Basándose en estos resultados, el sitio para unión del sustrato proteico de la FNR se describió como una superficie hundida, conteniendo cadenas laterales positivamente cargadas que interactúan con los residuos carboxilatos de la proteína sustrato (59). Recientemente, se ha obtenido una proteína de fusión entre la ferredoxina y la FNR de *Spinacia oleracea*, que mostró propiedades espectroscópicas y catalíticas similares a las del complejo disociable, indicando una configuración espacial de los dos grupos prostéticos comparable a la presente en el complejo fisiológico (112). Esta fusión Fd-FNR sería una herramienta interesante para obtener la estructura cristalográfica del complejo FNR/Fd, que hasta el momento no se ha elucidado (112). A pesar de no contarse con la estructura tridimensional de este complejo, se ha confirmado la

importancia de aminoácidos específicos en el establecimiento del mismo, mediante estudios de modificación química y mutagénesis dirigida (18, 98, 113-124).

1.2.9 Mecanismo catalítico de FNR

1.2.9.1 Los pasos en la vía catalítica

Estudios de cinética rápida demostraron que la transferencia de electrones catalizada por FNR desde Fd a NADP^+ procede a través de la formación de un complejo ternario, y permitieron postular un ciclo catalítico como el que se muestra en la **Figura 1.12** (103). La vía de reacción propuesta involucra dos reducciones sucesivas de un electrón de la isoaloxazina, seguidas de una transferencia de hidruro estereoespecífica en la cara A del anillo de nicotinamida (104), para producir NADPH (103). Estudios cinéticos extensivos han soportado varios pasos del ciclo (103, 107). Se encontró que la unión de Fd a FNR inhibe la reacción de la flavoproteína con NADP(H). En cambio, la ocupación por nucleótidos del sitio para unión de NADP^+ incrementa notablemente la transferencia de electrones desde Fd a FNR, disminuyendo la inhibición ejercida por la $\text{Fd}_{\text{oxidada}}$ unida (103). El NADP(H) facilita los pasos de disociación de las moléculas de $\text{Fd}_{\text{oxidada}}$ (reacciones 4 y 8 en la **Figura 1.12**), que son los limitantes de la reacción global (103). Por lo tanto, la interacción con los sustratos debe ser ordenada, uniéndose primero el NADP^+ y luego la $\text{Fd}_{\text{reducida}}$ (**Figura 1.12**). No se ha detectado la formación de especies de transferencia de carga entre $\text{FNR}_{\text{oxidada}}$ y NADPH durante el ciclo catalítico de la enzima (125).

Es razonable suponer que la reducción de $\text{Fd}_{\text{oxidada}}$ por NADPH ocurre a través de una vía catalítica inversa a la mostrada en la **Figura 1.12**, pero las bases experimentales que avalan esta hipótesis son escasas. Se ha informado que durante la oxidación de NADPH por aceptores artificiales de electrones la FNR participa con su

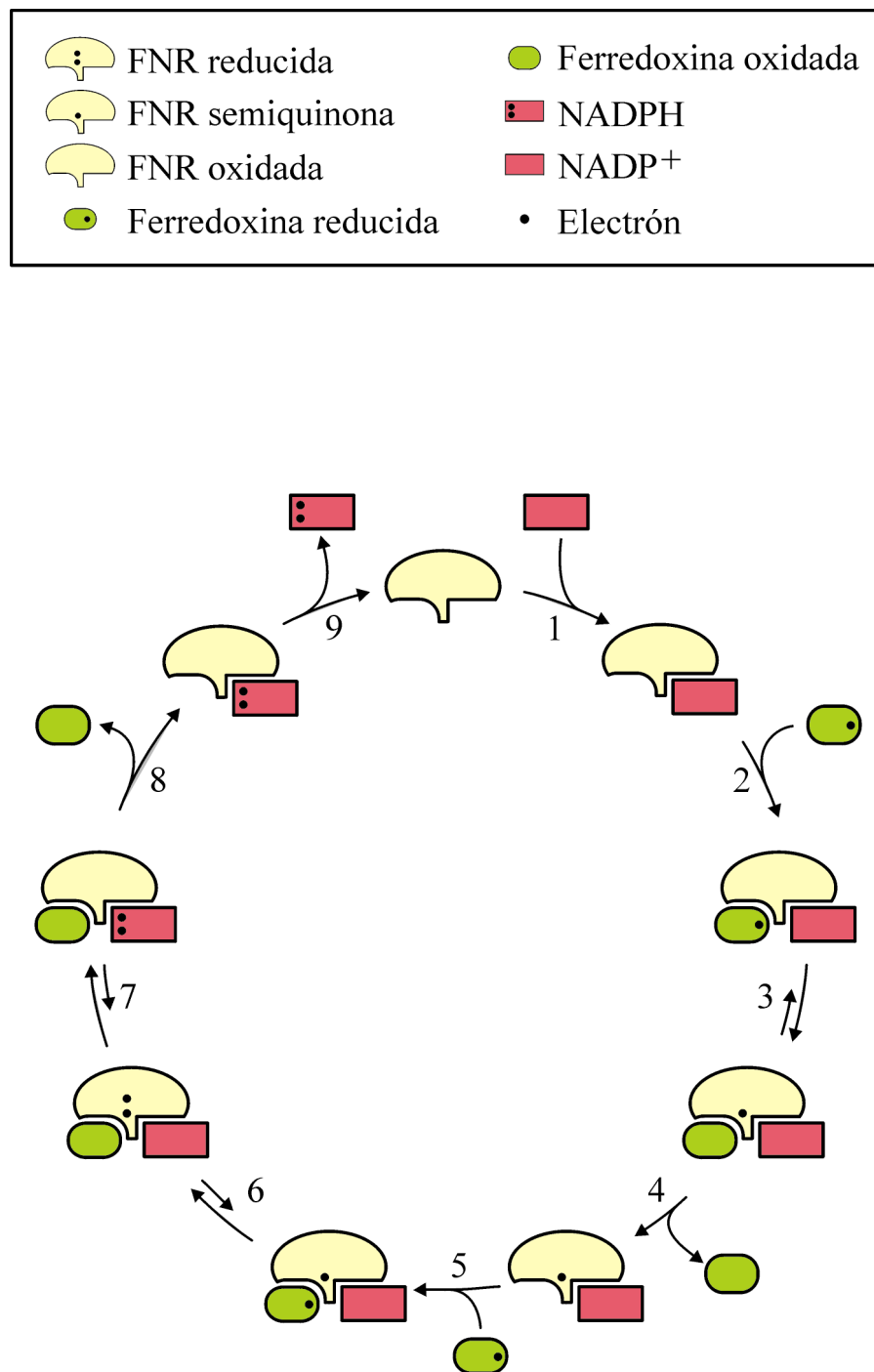


Figura 1.12. Vía catalítica propuesta para ferredoxina-NADP⁺ reductasa.

grupo prostético en un estado de semiquinona (125). En experimentos estáticos en los que se tituló anaeróbicamente la flavoproteína con NADPH se obtuvieron resultados similares (14, 126). La reducción de Fd o Fld puede acoplarse *in vitro* a una reacción en la cual los sustratos proteicos son rápidamente reoxidados por citocromo *c* (16). El análisis cinético de la actividad citocromo *c* reductasa (**Tabla 1.1**) en función de la concentración de NADPH permitió proponer para FNR un mecanismo catalítico tipo ping pong de transferencia en dos pasos (17). Sin embargo, se ha demostrado que los resultados de un análisis cinético de esa naturaleza también pueden interpretarse según el modelo propuesto en la **Figura 1.12**, dependiendo de las velocidades relativas de formación del complejo ternario y de transferencia intramolecular de electrones (17). Teniendo en cuenta las velocidades observadas en varios sistemas (17, 18), se puede asumir que el complejo $\text{Fd}_{\text{oxidada}}/\text{FNR}_{\text{oxidada}}/\text{NADPH}$ es rápidamente convertido en $\text{FNR}_{\text{semiquinona}}/\text{NADP}^+$ y $\text{Fd}_{\text{reducida}}$ (reacciones 7 a 5 en la **Figura 1.12**). Esto explicaría porque el complejo ternario y la flavina completamente reducida no se acumulan significativamente durante la catálisis enzimática en condiciones de estado estacionario.

1.2.9.2 Residuos que participan activamente en la catálisis

La disponibilidad de estructuras cristalográficas de distintos mutantes puntuales de FNR (98, 122), y de la enzima silvestre en distintos estados de oxidación (41, 59), ha permitido profundizar en los detalles del mecanismo catalítico de esta flavoenzima. El estudio de la FNR de *Pisum sativum* con sustituciones en el residuo carboxilo terminal (Tyr308 en *Pisum sativum*, Tyr314 en *Spinacia oleracea* y Tyr303 en *Anabaena* PCC7119), indicó que esta tirosina, cuya cadena lateral se desplazaría para dar cabida a la nicotinamida del NADP(H) (41), no desempeñaría un papel activo en la catálisis (127). Sin embargo, es posible que durante el ciclo catalítico, el grupo fenólico

de Tyr308 colabore con la fijación de la nicotinamida en una posición apropiada para la transferencia de electrones con la isoaloxazina del FAD (64).

Se ha propuesto que otros dos residuos bien conservados, correspondientes a Ser96 y Cys272 de FNR de *Spinacia oleracea*, interaccionan respectivamente con los átomos N5 de la flavina y C4 de la nicotinamida, ambos involucrados en la transferencia de hidruro (**Figura 1.1**). Las mutaciones en Ser96 produjeron dramáticos descensos en la eficiencia catalítica de FNR (128), en acuerdo con el papel fundamental asignado a este residuo. En cambio, el reemplazo de Cys272 causó sólo una moderada disminución en la actividad, sugiriendo que el grupo sulfidrilo no sería crucial para la catálisis (129). Avalando estos resultados, la estructura de FNR reducida de *Spinacia oleracea* muestra que la Ser96 se mueve hacia el átomo N5 del FAD, mientras que el anillo de isoaloxazina permanece planar (59). La reducción de FNR implica la protonación del átomo N5, que no está expuesto al solvente. Las fuentes posibles de este protón serían moléculas de agua estructurada cerca de este átomo, o el grupo hidroxilo de Ser96, quien a su vez podría obtener un protón de la cadena lateral de Glu312, expuesta a la superficie (59). Sin embargo, un estudio de FNR con sustituciones en Glu312, descartó esta posibilidad (122). Un análisis cinético completo, sumado a la obtención de las estructuras cristalográficas de estas mutantes, permitió afirmar que Glu312 no es el dador para la protonación del átomo N5 (19, 122). Se concluye que este residuo es requerido para posicionar adecuadamente a la nicotinamida en el sitio activo, y para sintonizar el potencial redox de la flavina en estado semiquinona, permitiendo una transferencia de electrones eficiente (19, 122). Estudios funcionales (119) y estructurales (130) de mutantes de FNR de *Anabaena* en Glu301 (equivalente a Glu312 de la enzima de espinaca) permitieron llegar a conclusiones similares respecto al papel desempeñado por este residuo durante la catálisis.

1.3 Objetivos del trabajo de Tesis

El objetivo general de este trabajo de Tesis es el estudio de la importancia evolutiva, funcional y estructural de los residuos aromáticos conservados en el sitio activo de las flavoproteínas de la superfamilia ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR), empleando como proteína modelo la FNR de arveja. A continuación se detallan los objetivos específicos de este estudio:

- 1) El análisis de la evolución de FNR, mediante la aplicación de técnicas de Filogenia Molecular a las secuencias proteicas de esta enzima, prestando especial atención a la conservación de los residuos aromáticos del sitio activo entre los diferentes grupos filogenéticos.
- 2) El estudio del papel desempeñado por los residuos tirosina del sitio activo en el mantenimiento de la estructura, la capacidad catalítica y la especificidad para los sustratos piridín nucleótidos de FNR.
- 3) La determinación del modo de unión productivo de la parte nicotinamida del sustrato NADP⁺ en el sitio activo de FNR, mediante el análisis cristalográfico de complejos enzima-sustrato de mutantes de FNR en la tirosina terminal.
- 4) El análisis teórico de las interacciones entre las cadenas laterales de las tirosinas conservadas en el sitio activo de FNR, y la flavina del grupo prostético FAD, mediante técnicas de modelado molecular *ab initio*.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Métodos computacionales

2.1.1 Determinación de la distribución de flavoenzimas entre las óxido-reductasas

La distribución de las flavoenzimas entre las óxido-reductasas representada en la **Figura 1.2**, fue determinada como se describe a continuación. En primer término, se extrajeron de la base de datos ENZYME versión 25.0 con actualización al 15 de enero de 2000 ([http:// www.biochem.ucl.ac.uk/ bsm/ enzymes/ enzrefs.html](http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/enzymes/enzrefs.html)), todos los registros de enzimas de la clase_{N1} (óxido-reductasas). De este grupo se seleccionaron todos los registros que contenían palabras clave relacionadas a flavoproteínas (FAD, FMN, flavina o riboflavina) en el campo "grupo prostético". La búsqueda bibliográfica acerca del grupo prostético de un número representativo de estas enzimas, permitió confirmar en todos los casos la clasificación de las mismas como flavoproteínas. Sin embargo, muchas enzimas identificadas como flavoproteínas según los datos de literatura, no contenían ningún tipo de información relativa a un grupo prostético en el registro correspondiente de la base de datos.

Para detectar las flavoenzimas que no resultaron seleccionadas con la base ENZYME, se consultó la base de datos BRENDA (BRENDA: The enzyme database, [http:// www.uni-koeln.de/ math-nat-fak/ biochemie/ ds/ dsbren_e.htm](http://www.uni-koeln.de/math-nat-fak/biochemie/ds/dsbren_e.htm)) actualizada al 2 de febrero de 2000. Esta base compila información funcional y estructural de todas las enzimas conocidas e incluye más de 35000 referencias bibliográficas relacionadas a las mismas. A diferencia de la facilidad que brinda ENZYME, en la base BRENDA no es posible extraer de forma automatizada todas las enzimas con un grupo prostético determinado, ya que el campo correspondiente no distingue entre grupo prostético o

cofactor dissociable. Además, en muchos casos la palabra clave se emplea en la expresión de una idea contraria al objeto de la búsqueda (por ejemplo, "Cofactor / Grupo prostético: no contiene FAD."). Por lo tanto se adoptó la siguiente estrategia: primero se extrajeron todas las óxido-reductasas que contenían las palabras claves FAD, FMN, flavina o riboflavina en el campo Cofactor / Grupo prostético, luego se descartaron aquellas que ya habían sido reconocidas como flavoproteínas con la base ENZYME. Como último paso, se detectaron manualmente entre las restantes, las enzimas que contenían derivados de flavinas como grupo prostético. Cuando la información disponible en el registro de la base BRENDA no era suficiente, se consultó la bibliografía disponible acerca de la enzima en cuestión. Finalmente, se representó el número total de enzimas y el número total de flavoenzimas, para cada una de las clases_{1,N2,N3} existentes.

2.1.2 Obtención y alineamiento de secuencias proteicas

Todos los alineamientos de secuencias aminoacídicas se llevaron a cabo empleando el programa CLUSTALW versión 1.7 para DOS (131). Las características particulares de cada alineamiento se detallan en las secciones de resultados correspondientes. El alineamiento estructural de la **Figura 1.9** se realizó a partir de un alineamiento de secuencias primarias, y posteriormente se refinó manualmente teniendo en cuenta la información disponible acerca de las estructuras secundaria y terciaria.

Los análisis filogenéticos de FNR se basaron en las secuencias depositadas en la base de datos GenBank y en la base del Institute for Genomic Research (TIGR), actualizadas al día 15 de enero de 2000. Las mismas se obtuvieron a través de los servicios de búsqueda por similitud de GenBank, empleando el programa TBLASTN 2.0.9 (132) sobre las siguientes subbases: base de nucléotidos no redundante, base de EST (Expressed Sequence Tag) y base de genomas incompletos. Las secuencias

proteicas alineadas en la **Figura 3.1** y **Figura 3.4**, cuyos números de acceso corresponden a bases de datos de ADN, fueron deducidas a partir de las correspondientes secuencias de nucleótidos.

2.1.3 Construcción de árboles filogenéticos basados en secuencias de proteínas

Para la construcción de los árboles filogenéticos se emplearon diferentes programas del paquete PHYLIP versión 3.573c para Windows 9X/NT (133). Las matrices de distancias evolutivas se calcularon a partir del correspondiente alineamiento múltiple con el programa PROTDIST, empleando matrices PAM derivadas del modelo de sustitución de aminoácidos de Dayhoff (134). Los árboles filogenéticos se obtuvieron a partir de las matrices de distancias evolutivas con el programa NEIGHBOR, basado en el método de agrupamiento del vecino más cercano o Neighbor-joining (135). Los límites de confianza para cada topología inferida se estimaron mediante el método de remuestro denominado autodocimasia o "bootstrap" (136). Se generaron 1000 alineamientos remuestrados con el programa SEQBOOT, que fueron procesados con los programas PROTDIST y NEIGHBOR, de la misma forma que el alineamiento de secuencias original. Los 1000 árboles resultantes de los datos remuestrados se procesaron con el programa CONSENSE para obtener un árbol consenso. Los límites de confianza obtenidos por autodocimasia se expresan como porcentajes asociados a cada una de las ramas internas de un árbol filogenético consenso. Cada número indica la cantidad de árboles donde se observaron los dos grupos que la rama define, por cada 100 árboles provenientes de los datos remuestrados. Los árboles consenso obtenidos se graficaron empleando el programa TreeView versión 1.6.0 para Windows 9X/NT (137).

2.1.4 Obtención, procesamiento y representación de estructuras tridimensionales de proteínas

Las estructuras tridimensionales de proteínas se obtuvieron de la base Protein Data Bank (72) y se graficaron empleando las versiones para el sistema operativo Windows9X (Microsoft) de los programas RasMol versión 2.7.1 (R. Sayle & H. Bernstein) y Hyperchem versión 5.02 (HyperCube). Este último programa también se utilizó para la determinación de ángulos y distancias interatómicas en distintas flavoproteínas. Los alineamientos de estructuras tridimensionales homólogas y los cálculos de RMS se efectuaron con el programa Swiss-PdbViewer versión 3.51 (Glaxo Wellcome Research & Development).

2.1.5 Cálculos mecánico-cuánticos

Los sistemas modelados consistieron en todos los casos de moléculas neutras en el vacío compuestas por átomos de hidrógeno, carbono, nitrógeno u oxígeno, cuyas geometrías y disposiciones iniciales en el espacio se derivaron de datos cristalográficos y de distancias estándar de enlace para asignar las posiciones de los átomos de hidrógeno. Los cálculos mecánico-cuánticos se realizaron empleando métodos *ab initio*, bajo la teoría de orbitales moleculares a nivel Hartree-Fock restringido 3-21G**. Para los átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno el conjunto de bases de valencia dividida con funciones de polarización **3-21G**** consiste de **3** funciones gaussianas primitivas para la función de capa interna tipo s, **2** funciones gaussianas primitivas para la función de capa interna de valencia tipo s y tipo p, y **1** función gaussiana primitiva para la función de capa externa tipo sp. Para los átomos de hidrógeno, que no poseen capas internas, sólo se emplean dos funciones de valencia tipo s con **2** y **1** funciones gaussianas primitivas. El doble asterisco del acrónimo indica el

agregado de seis funciones de polarización tipo d para los átomos pesados y tres funciones de polarización tipo p para los átomos de hidrógeno (138).

2.1.5.1 Parámetros y opciones empleados en los cálculos mecánico-cuánticos

Los cálculos mecánico-cuánticos se realizaron con el programa Hyperchem versión 5.02 para Windows 9X de la compañía HyperCube. En todos los casos se crearon archivos de registro con un nivel de detalle igual a 3 (*LOG file Quantum Print Level = 3*). Los archivos de registro fueron importados a hojas de cálculo del programa Excel versión 97 SR-2 para Windows 9X de la compañía Microsoft. Con este programa se efectuó un análisis automatizado de la matriz de orbitales moleculares y se graficaron las curvas de energía potencial. Todos los cálculos se realizaron en una computadora tipo PC compatible con procesador Intel Pentium III 550 Mhz y 256 Mb de memoria de acceso aleatorio tipo dinámica sincrónica con verificación y corrección de errores (SDRAM ECC). A continuación se especifican los parámetros y las opciones del programa Hyperchem tales como fueron definidos para calcular todos los sistemas moleculares estudiados:

Método *Ab Initio*:

Conjunto de Bases	
Otros:	3-21G**
Opciones	
Carga y Espín	
Carga Total:	0
Apareamiento de Espín:	HF Restringido
Interacción de Configuraciones:	
Método de Interacción de Configuraciones:	no
Controles de Campo Autoconsistente	
Límite de Convergencia:	10^{-6}
Límite de Iteraciones:	200
Convergencia Acelerada:	sí
Sólo Punto Simple	
Gradiente:	no
Energía de Correlación Møller-Plesset 2:	no

Opciones Avanzadas del Método *Ab Initio*

Control de las Integrales de 2 Electrones	
Valor de Corte:	10^{-10}
Tamaño de la Memoria Intermedia:	32000
Formato de las Integrales:	regular
Cálculo Directo del Campo Autoconsistente:	no
Control de Átomos Fantasma:	no
Cálculo Inicial de los Orbitales Moleculares:	núcleo Hamiltoniano
Número de Orbitales d:	6
Funciones Base Adicionales	
Tipo de Capa:	no
Exponente:	no

2.2 Obtención de diferentes formas de ferredoxina-NADP⁺ reductasa**2.2.1 Cepas bacterianas**

La expresión de las distintas formas de ferredoxina-NADP⁺ reductasa analizadas durante el desarrollo de este trabajo de Tesis se realizó en la bacteria *Escherichia coli* cepa JM109, cuyo genotipo es *recA1 endA1 thi hsdR17 (lacproAB)/F' traD36 lacI^q (lacZ) M15 proAB* (139).

2.2.2 Medios de cultivo

Medio de Luria Bertani (LB): peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l en agua desionizada. Cuando fue requerida la utilización del medio sólido se agregaron 20 g/l de agar de la compañía DIFCO.

2.2.3 Plásmidos utilizados para expresar ferredoxina-NADP⁺ reductasa en *Escherichia coli*

El vector pGEX-3X de 4952 pares de bases (140) contiene el ADNc que codifica la glutatión *S*-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, bajo el control del promotor fuerte *tac*, un híbrido de los promotores de los operones triptofano y lactosa de *E. coli*. La expresión de este gen es reprimida por el producto del gen *lacI^q* e inducida por IPTG. La inserción en la fase correcta de una secuencia codificante en el

sitio de múltiple clonado de este vector, localizado en el extremo 3' del gen de GST, conduce a la síntesis de una proteína de fusión. Esta región ha sido manipulada genéticamente a fin de introducir cuatro tripletes que codifican para la secuencia de reconocimiento de la endoproteasa sitioespecífica Xa. La proteína expresada puede separarse de la GST, de 27,6 kDa, por digestión del producto de fusión con el factor Xa (140). Las células transformadas con este plásmido pueden seleccionarse por resistencia a Cb.

La expresión de las proteínas de fusión entre GST y las distintas formas de FNR de *Pisum sativum* se llevó a cabo empleando plásmidos derivados del pGEX-3X provistos por los autores respectivos. Los plásmidos que dirigieron la síntesis de las fusiones GST-FNR mutantes en Y89 (141) y de las fusiones GST-FNR mutantes en Y308 (127) fueron obtenidos por mutagénesis sitio dirigida a partir del pGF205, que permite la expresión de la GST-FNR silvestre (37). La tirosina fue reemplazada por fenilalanina (GST-FNR Y89F), por triptofano (GST-FNR Y89W, GST-FNR Y308W), por serina (GST-FNR Y89S, GST-FNR Y308S) y por glicina (GST-FNR Y89G).

2.2.4 Transformación de *Escherichia coli* con ADN plasmídico

La transformación de células de *Escherichia coli* JM109 con los diferentes plásmidos utilizados se llevó a cabo mediante el procedimiento del cloruro de calcio (139). Básicamente, se crecieron células de la cepa elegida en medio LB hasta saturación del cultivo. Se realizó una dilución 1/100 de este cultivo en medio fresco y se creció hasta una densidad óptica de 0,4 a 600 nm. Una vez alcanzado este grado de crecimiento se cosecharon las células por centrifugación y se resuspendieron en MOPS 10 mM, KCl 10 mM, a pH 7, en un volumen igual a la mitad del medio de cultivo. Las células fueron centrifugadas y el sedimento resuspendido en un volumen igual de MOPS 0,1 M, KCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, a pH 6,5 y se incubaron a 4°C durante 15

minutos. Una vez transcurrido este tiempo las células fueron centrifugadas nuevamente y resuspendidas en 100 µl de la misma solución. Luego se agregaron 20 ng a 150 ng de ADN a estas células competentes, se incubaron en hielo durante 1 hora y se colocaron en un baño de 42°C durante 2 minutos. Inmediatamente después se agregó 1 ml de medio LB fresco con glucosa 2 % y se incubó durante una hora a 37°C. Finalmente se plaquearon 200 µl del medio en cajas de Petri conteniendo LB agar con 100 µg/ml del antibiótico ampicilina.

2.2.5 Condiciones generales aplicadas durante las distintas etapas de las purificaciones proteicas

Todas las etapas de las distintas purificaciones de proteínas se llevaron a cabo en una cámara refrigerada a una temperatura de 4°C. Siempre que fue factible se tomaron alícuotas para evaluar los resultados de las separaciones cromatográficas, digestiones, diálisis y concentración de las muestras. Según resultó necesario, las alícuotas fueron sometidas a determinación de actividad diaforasa, cuantificación de proteínas totales, o electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

2.2.6 Obtención de ferredoxina-NADP⁺ reductasa como productos de fusión con glutatión S-transferasa (GST-FNR)

2.2.6.1 Preparación de los extractos celulares

El clon de *E. coli* JM109 portando el plásmido adecuado para la expresión de la variante de GST-FNR de interés se creció en 10 ml de medio LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina hasta saturación del cultivo, en un agitador rotatorio termostatzado a 37°C. Se realizó una dilución 1/100 de este cultivo en 300 ml de medio LB fresco con 100 µg/ml de ampicilina y se creció hasta saturación del cultivo en las mismas condiciones. Los 300 ml de cultivo saturado se inocularon en el vaso de un fermentador

MicroFerm (New Brunswick) conteniendo 10 l de LB fresco con 100 mg/l de ampicilina y 75 μ l/l de antiespumante A (Sigma). Se dejó crecer el cultivo en el fermentador a una temperatura de 37°C, con agitación de 250 rpm y un flujo de aire de 10000 a 12000 cm^3/min , durante 2 a 3 hs hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8 a 1,2 a 600 nm. Luego se disminuyó la temperatura a 30°C y se indujo la expresión de las proteínas recombinantes mediante el agregado de IPTG 2,5 mM, continuando el crecimiento de 6 a 8 hs hasta alcanzar una densidad óptica de 2,9 a 3,2 a 600 nm. Luego el vaso fue desconectado del equipo fermentador, manteniéndose durante la noche en una cámara a 4°C. A la mañana siguiente se cosecharon las células y se lavaron con Tris-HCl 50 mM a pH 7,6 mediante centrifugaciones de 7 min a 8000 rpm en un rotor GS3. El peso húmedo de las células cosechadas varió entre 45 y 65 g. Las células fueron resuspendidas en 60 ml de solución de ruptura compuesta por Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, a pH 7,6. Las células resuspendidas se sometieron a tres ciclos de ruptura celular en una prensa tipo French, empleando una celda de 35 ml. Para eliminar la gran cantidad de ADN liberado luego de la ruptura celular se agregaron 10 μ g de ADNasa por cada gr de peso húmedo de las células cosechadas inicialmente y MgCl_2 hasta una concentración final de 0,5 mM. El lisado fue clarificado por ultracentrifugación a 45000 rpm en un rotor Ti80 durante 45 min, a una temperatura de 4°C. El sedimento fue descartado y el sobrenadante se conservó a 4°C hasta su procesamiento.

2.2.6.2 Purificación de GST-FNR mediante cromatografía de afinidad

La fusión GST-FNR se purificó del extracto de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad con matriz de glutatión agarosa (37, 140). Se utilizó una columna de 20 cm de altura y 2,5 cm de diámetro conteniendo 80 ml de matriz equilibrada con solución reguladora A, compuesta por Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM,

a pH 7,6. Se recircularon 60 ml de extracto a través de la columna durante 10 a 14 hs. Luego la columna se lavó con 500 ml de solución reguladora A. La elución de las proteínas afines a la matriz de glutatión agarosa se realizó con glutatión reducido 10 mM en solución reguladora A. Se seleccionaron y mezclaron las fracciones de eluato que resultaron de interés. Finalmente la preparación se dializó contra Tris-HCl 10 mM pH 7,6 y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min para separar los agregados insolubles. Se obtuvieron de 5 a 70 mg de proteína de fusión dependiendo de la variante de GST-FNR purificada.

2.2.7 Digestión de GST-FNR con endoproteasa Xa y purificación a homogeneidad de ferredoxina-NADP⁺ reductasa

La proteína de fusión GST-FNR purificada como se describe en la sección anterior se escindió en GST y FNR ajustando el medio a Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 1 mM y agregando 1 µg de proteasa Xa (Promega) por cada mg de proteína de fusión. Luego de 12 hs de incubación a 18°C se tomó una alícuota y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS para analizar la extensión del corte. Cuando resultó necesario se repitieron hasta tres veces los pasos de agregado de Xa, incubación y análisis en geles.

Una vez escindida la fusión se procedió a separar la FNR de la GST y del remanente de proteína de fusión no cortada mediante cromatografía de intercambio iónico con matriz Macroprep-DEAE (Biorad). Se utilizó una columna de 50 cm de altura y 2,5 cm de diámetro conteniendo 100 ml de matriz equilibrada con Tris-HCl 50 mM a pH 7,6. Previamente a su carga en la columna, la muestra fue centrifugada a 15000 rpm durante 15 min para separar los agregados insolubles, y el sobrenadante se diluyó cinco veces con Tris-HCl 50 mM a pH 7,6 para disminuir la concentración de NaCl y permitir su interacción con la matriz Macroprep-DEAE. Posteriormente se

realizó un lavado con 300 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,6. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente lineal de NaCl 0-400 mM en 300 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,6. En estas condiciones el remanente de fusión sin escindir y la GST se retardaron respecto a la FNR. Seguidamente se seleccionaron las fracciones de eluato con FNR pura y se concentraron empleando una columna de 10 cm de altura y 1 cm de diámetro cargada con 5 ml de matriz Macrorep-DEAE. Las fracciones seleccionadas en el paso anterior se mezclaron y se diluyeron diez veces con Tris-HCl 50 mM a pH 7,6 para reducir la concentración de NaCl. La muestra se cargó en la columna y se lavó con 20 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,6. La elución se realizó con 10 ml de Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, a pH 7,6. El avance del frente de FNR a través de la columna pudo seguirse a simple vista gracias a su coloración amarillenta. Mediante esta técnica se alcanzaron concentraciones de hasta 15 mg/ml de FNR. Las fracciones de interés se dializaron extensivamente contra Tris-HCl 50 mM a pH 7,6 y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis. El rendimiento final resultó de 5 a 30 mg dependiendo de la variante de FNR purificada.

2.2.8 Obtención de ferredoxina-NADP⁺ reductasa libre de NADP⁺

Para desplazar el NADP⁺ unido firmemente a las mutantes FNR Y308S se la incubó con 2'-P-AMP 10 mM, Tris-HCl 50 mM, a pH 7,6. Luego se separó el NADP⁺ de la muestra mediante una cromatografía de filtración por gel con matriz Sephadex G-25. Se utilizó una columna de 20 cm de altura y 2 cm de diámetro conteniendo 30 ml de matriz equilibrada con 2'-P-AMP 3 mM, Tris-HCl 50 mM, a pH 7,6. Una vez eliminado el NADP⁺ se procedió a separar el complejo FNR/2'-P-AMP de la FNR libre de ligandos mediante cromatografía de intercambio iónico con matriz Macrorep-DEAE. Se utilizó una columna de 50 cm de altura y 2,5 cm de diámetro conteniendo 100 ml de matriz equilibrada con Tris-HCl 50 mM a pH 7,6. Luego de fijar la muestra a la matriz,

se realizó un lavado con 500 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,6. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente lineal de NaCl 0-500 mM en 300 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7,6. En estas condiciones la FNR con 2'-P-AMP unido se retardó respecto de la FNR sin 2'-P-AMP. Las fracciones conteniendo FNR libre de ligandos se concentraron y se dializaron como se describe en la sección 2.2.7.

2.2.9 Electroforesis de proteínas

Los análisis de patrones proteicos se realizaron mediante electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (142). Las muestras conteniendo aproximadamente 50 µg de proteínas totales se desnaturalizaron por ebullición antes de la siembra durante 3 min en Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 % (v/v), glicerol 10 % (v/v), SDS 2 % (p/v), azul de bromofenol 0,15 mg/ml, a pH 8,0. La concentración de acrilamida utilizada en los geles de separación fue de 12 % (p/v) y en los geles de concentración de 5 % (p/v). Las electroforesis fueron desarrolladas a una intensidad constante de 20 mA durante 3 hs. Posteriormente los geles fueron electrotransferidos como se detalla en la sección 2.2.11, o teñidos como se describe a continuación. Inicialmente se fijaron las proteínas mediante incubación de los geles durante 10 min en ácido acético 10 % (v/v), y luego éstos fueron teñidos durante 45 min con Azul de Coomassie R250 0,2 % (p/v) en metanol 50 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v) y decolorados durante 2 hs con metanol 40 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v).

2.2.10 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en muestras líquidas se determinó mediante un ensayo de unión del colorante azul de Coomassie G250 (143). La determinación de la cantidad de proteína presente en geles de poliacrilamida se realizó mediante digitalización y densitometría de las bandas empleando el programa de tratamiento de

imágenes Adobe Photoshop versión 5.0 para Windows9X. En ambos casos, se utilizó como patrón albúmina sérica bovina o FNR pura dosada espectrofotométricamente.

2.2.11 Transferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa ("Western blot")

Las proteínas separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa en una cuba de transferencia (Trans-blot, Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo durante 15 horas a 4°C con una intensidad constante de 75 mA en una solución conteniendo Tris 20 mM, glicina 150 mM, SDS 0,02 % (p/v), metanol 20 % (v/v), a pH 8,0. Una vez concluida la transferencia, la membrana fue lavada con solución PBS (NaCl 13,7 mM, KCl 0,27 mM, Na₂HPO₄ 0,43 mM, KH₂PO₄ 0,14 mM, a pH 7,3) conteniendo 5 % (p/v) de leche en polvo descremada de origen comercial. Estos lavados tuvieron una duración de 15 minutos, con agitación y se repitieron cuatro veces. Luego del cuarto lavado se incubó la membrana durante una hora con el anticuerpo anti ferredoxina-NADP⁺ reductasa disuelto en 25 ml de PBS, leche 5 %. Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron nuevamente cuatro lavados de 15 min con PBS, leche 5 %. Posteriormente se incubó la membrana durante 1 hora con un anticuerpo anti IgG conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Biorad), disuelto en la misma solución PBS, leche 5 %. Luego de una hora de incubación con agitación, se realizaron cuatro nuevos lavados de 15 minutos con solución PBS, leche 5 % y un lavado con una solución conteniendo Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, a pH 9,0. Luego de diez minutos se colocó la membrana en una solución de igual composición a la cual se agregó BCIP 0,2 % (p/v) y NBT 0,4 % (v/v), a partir de soluciones madre de 50 mg/ml en dimetilformamida y 75 mg/ml en 70 % (v/v) dimetilformamida, respectivamente. La membrana se incubó en oscuridad hasta desarrollo del precipitado coloreado de formazán sobre la misma (144). Los

anticuerpos IgG anti ferredoxina-NADP⁺ reductasa se obtuvieron de antisuero de conejos tratados con ferredoxina-NADP⁺ reductasa purificada de espinaca.

2.3 Técnicas aplicadas a ferredoxina-NADP⁺ reductasa pura

2.3.1 Determinación de actividad diaforasa

La actividad diaforasa dependiente de NADPH de las distintas formas de ferredoxina-NADP⁺ reductasa fue medida en un medio de reacción que contenía Tris-HCl 50 mM, glucosa 6-fosfato 3 mM, NADP⁺ 0,3 mM, a pH 8,0 y una unidad de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en 1 ml de volumen final. Como aceptor de electrones se utilizó K₃Fe(CN)₆ a una concentración saturante de 1 mM. El coeficiente de extinción para el K₃Fe(CN)₆ es $\epsilon_{420} = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (145). El avance de la reacción se siguió por disminución de la absorbancia a 420 nm, registrada con un espectrofotómetro Gilford Response. Todas las medidas se realizaron a una temperatura de 20°C.

2.3.2 Determinación de parámetros cinéticos

Para estimar los parámetros cinéticos de la reacción NAD(P)H-K₃Fe(CN)₆ diaforasa catalizada por las distintas variantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa, se determinaron las velocidades iniciales de reducción de K₃Fe(CN)₆ en presencia de diferentes concentraciones de NADPH o de NADH y una concentración fija de K₃Fe(CN)₆ 1 mM que resultó saturante en todos los casos. La disminución de K₃Fe(CN)₆ se registró como se indica en la sección 2.3.1. El medio de reacción en presencia del sustrato NADPH contenía Tris-HCl 50 mM, glucosa 6-fosfato 3 mM, a pH 8,0 y una unidad de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en 1 ml de volumen final. Las medidas en presencia de NADH se realizaron en el mismo medio, omitiendo el sistema regenerante para el piridín nucleótido reducido. Todas las medidas se realizaron a una temperatura de 20°C. Los parámetros cinéticos estimados se obtuvieron mediante un

ajuste no lineal de los datos cinéticos al modelo mecanístico de la enzima empleando el programa SigmaPlot para Windows versión 4.01 (SPSS Inc.).

2.3.3 Extracción y dosaje de FAD proveniente de GST-FNR

El FAD fue extraído de alícuotas de las proteínas de fusión purificadas, mediante tratamiento con ácido tricloroacético 5 % (v/v) durante 5 min a 20°C, y centrifugación a 4°C, 15000 rpm durante 15 min. Se separó el sobrenadante conteniendo FAD libre y se realizó una segunda extracción de FAD del sedimento resultante. Los agregados de apoproteína se descartaron y los sobrenadante de ambas extracciones se mezclaron y se neutralizaron con K_2HPO_4 2 M. Posteriormente se cuantificó el FAD mediante espectrofluorometría (λ de excitación = 456 nm, λ de máxima emisión = 526 nm). Los valores obtenidos se interpolaron en una curva de calibración realizada en idénticas condiciones con cantidades de FAD conocidas, para obtener la concentraciones de FAD en las alícuotas de GST-FNR.

2.3.4 Proteólisis controlada de GST-FNR

Los experimentos de proteólisis controlada de las mutantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa en el residuo Y89 fueron realizados como los describieron Gadda y colaboradores (146). Las proteínas disueltas en Tris-HCl 50 mM, $CaCl_2$ 5 mM, a pH 8,0 se sometieron a la proteólisis mediante el agregado de termolisina en una relación 1:10 en peso con respecto a la proteína de fusión. La reacción se llevó a cabo a 25°C y fue interrumpida a diferentes tiempos, tomando alícuotas y colocándolas en tubos con EDTA 10 mM. Las mismas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y posterior transferencia e inmunorreveado.

2.3.5 Análisis espectroscópicos de absorción electrónica

Los espectros de absorción electrónica se registraron con un

espectrofotómetro Gilford Response. Los datos obtenidos se importaron a hojas de cálculo del programa Excel versión 97 SR-2 para Windows 9X para su procesamiento y representación. Antes de registrar los espectros de las distintas formas de FNR, las muestras se centrifugaron a 4°C, 15000 rpm durante 15 min para separar posibles agregados. Luego, el sobrenadante se cargó a una columna de 15 cm de altura y 2 cm de diámetro conteniendo 30 ml de una matriz de exclusión molecular Biogel PGD-6 (Biorad) equilibrada con Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, para retener el FAD libre que pudiera haber en las muestras de la flavoproteína. Los coeficientes de extinción de las mutantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa en el residuo Y89 se determinaron mediante la cuantificación espectrofotométrica del FAD liberado por tratamiento de las proteínas con SDS 0,2 % (p/v) e incubación a 42°C durante 5 min (128).

2.3.6 Determinación de las constantes de disociación de los complejos entre distintas variantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa y piridín nucleótidos

Las constantes de disociación de los complejos entre distintas variantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa y NAD(P)⁺ se calcularon a partir de espectros de absorción electrónica diferenciales obtenidos mediante titulación espectrofotométrica de las proteínas con los correspondientes ligandos. Las muestras de FNR se diluyeron en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0 hasta una concentración final aproximada de 50 μM y se registró el espectro de absorción electrónica. Luego se registraron los espectros al cabo de cada adición del nucleótido y se obtuvieron los espectros diferenciales mediante el procesamiento computarizado de los datos. Cada espectro diferencial se calculó sustrayendo el espectro de FNR y del ligando al espectro de FNR en presencia del ligando, teniendo en cuenta los factores de dilución. Se empleó el término *coeficiente de extinción diferencial* para referir a las diferencias entre los coeficientes de extinción de

dos espectros. La perturbación espectral analizada para estudiar la afinidad de la enzima por NAD(P)^+ fue el cambio en el coeficiente de extinción diferencial en la región de 515 nm o $\Delta\epsilon_{515}$ (122, 128, 129). Los datos se ajustaron a la ecuación teórica correspondiente al modelo de unión de un ligando a un sitio único en la enzima, empleando el programa SigmaPlot para Windows versión 4.01 (SPSS Inc.). Como resultado de cada análisis de regresión se obtuvieron estimaciones de la constante de disociación del complejo FNR/NAD(P)^+ y del coeficiente de extinción diferencial máximo a 515 nm.

2.3.7 Determinación de las estructuras tridimensionales de distintas variantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa

La cristalización, experimentos de difracción de rayos X, resolución y refinamiento de las estructuras cristalográficas de las distintas variantes de FNR fueron realizados por Zhan Deng y P. Andrew Karplus en la Universidad de Cornell, Ithaca, USA, en el marco de un proyecto en colaboración con el grupo de investigación del que formo parte en la Universidad Nacional de Rosario (147).

2.3.7.1 Cristalización y adquisición de los datos de difracción

La solución madre de cada FNR a cristalizar consistió de 4,5 mg/ml de proteína en K_2HPO_4 5 mM a pH 8. Los cristales de FNR Y308S crecieron a 25°C en gotas colgantes formadas por volúmenes iguales de solución madre de proteína y una solución conteniendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,1 M y Tris-HCl 100 mM a pH 8,0. La cristalización de FNR Y308S con o sin la adición de NADP^+ dio idénticos resultados. Los cocristales de Y308W/ NADP^+ crecieron bajo las mismas condiciones, en presencia de NADP^+ 10 mM. Todos los cristales resultaron isomorfos y pertenecieron al grupo espacial P2_1 . Los datos de difracción de rayos X a temperatura ambiente se colectaron con un detector de

área San Diego Multiwire System con generador de rayos X de ánodo rotatorio (Cu-K α) Rigaku RU200 operado a 50 kV y 150 mA, y fueron procesados empleando Scalepack (148). Los datos de difracción de sincrotrón se colectaron de los cristales congelados a 100 K. Antes de ser montados, los cristales se embebieron en un licor madre artificial compuesto por (NH₄)₂SO₄ 2,9 M y Tris-HCl 100 M a pH 8,0. Luego se transfirieron a una serie de lícores madre artificiales conteniendo concentraciones crecientes de hasta 25 % (v/v) de glicerol y finalmente fueron rápidamente congelados bajo una corriente de nitrógeno a 100 K.

Para obtener los complejos FNR Y308S/NADPH, un cristal de FNR Y308S se embebió en licor madre artificial conteniendo NADPH 100 mM. Los cristales cambiaron gradualmente de amarillo a azul-verde en aproximadamente 30 minutos, se transfirieron al licor madre artificial conteniendo glicerol 25 % (v/v) y NADPH 100 mM, y finalmente se congelaron instantáneamente. Los cristales permanecieron de color azul-verde durante todo el periodo de adquisición de datos. Las imágenes de difracción se integraron empleando MOSFLM (149) y finalmente los datos se redujeron y escalaron empleando TRUNCATE y SCALA del paquete de programas CCP4 (150).

2.3.7.2 Determinación y refinamiento de las estructuras cristalográficas

La búsqueda por reemplazo molecular se realizó con el programa AMoRe (151) contra el conjunto de datos de Y308S a temperatura ambiente oscilando desde 10 a 4 Å. Como modelo para la búsqueda se empleó un monómero de FNR silvestre parcialmente refinado, que cristalizó bajo condiciones diferentes y correspondió a un grupo espacial distinto. La estructura de FNR silvestre de arveja mostró que el residuo Y308 se orienta en forma similar al residuo Y314 de FNR de espinaca, confirmando la relevancia de estos experimentos. La búsqueda por reemplazo molecular rindió dos soluciones distintas representando dos monómeros en la unidad asimétrica. Después del

refinamiento de cuerpo rígido, el coeficiente de correlación y el factor B resultaron ser 0,68 y 0,34 respectivamente. Un mapa inicial de densidad electrónica diferencial mostró claramente la presencia de una molécula completa de NADP^+ . Todos los refinamientos cristalográficos se efectuaron empleando X-PLOR (152) e incluyeron correcciones por difracción anisotrópica.

El modelo final a temperatura ambiente ($R = 0,181$; $R_{\text{libre}} = 0,236$) fue refinado posteriormente sin restricciones de simetría no cristalográficas, contra un conjunto de datos a baja temperatura con resolución de 1,8 Å. Gradualmente se introdujeron moléculas de solvente en la estructura, en posiciones estereoquímicamente razonables. En la última etapa de refinamiento la densidad electrónica indicó claramente que el segmento peptídico comprendiendo los primeros 13 residuos aminoterminales de un monómero estaba unido inespecíficamente a la interface de un dímero vecino relacionado por simetría cristalográfica. El modelo final consistió de dos monómeros (monómero A: residuos 1 a 308, monómero B: residuos 14 a 308), dos moléculas de NADP^+ , un anión sulfato, un anión fosfato y un total de 721 moléculas de agua ordenadas. Luego, esta estructura fue utilizada como un modelo inicial para los refinamientos de los complejos entre la mutante FNR Y308S con NADPH y la mutante FNR Y308W con NADP^+ . En este último complejo, la ocupación del sitio activo por la cadena lateral del residuo W308 o por la nicotinamida fue refinada variando el grado de ocupación relativa de cada grupo y realizando luego un refinamiento de factor B restringido individualmente hasta la obtención de factores B razonables.

2.3.7.3 Coordenadas cristalográficas

Las coordenadas y los factores de estructura fueron depositados en la base Protein Data Bank (72), con códigos de acceso **1QFY** para el complejo entre la mutante FNR Y308S y NADP^+ , **1QFZ** para el complejo entre la mutante FNR Y308S y NADPH, **1QGA** para el complejo entre la mutante FNR Y308W y NADP^+ y **1QG0** para FNR silvestre.

3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS FERREDOXINA-NADP⁺ REDUCTASAS TIPO PLASTÍDICAS

3.1 Introducción

La reconstrucción de árboles filogenéticos a partir de datos moleculares es el principal objetivo de la Filogenia Molecular, una de las ramas de la Evolución Molecular (153). Esta disciplina ha experimentado un gran desarrollo debido principalmente al crecimiento exponencial de las bases de datos biomoleculares y al vertiginoso aumento de la capacidad de cómputo acaecidos durante la última década. Estos avances han permitido la aplicación intensiva de la Filogenia Molecular, tanto en el establecimiento de relaciones filogenéticas entre organismos, como en el estudio evolutivo de un gen o un producto génico en particular.

Los datos primarios empleados durante los inicios de la Filogenia Molecular fueron secuencias de proteínas homólogas (154). Cuando se comparan secuencias biomoleculares es común el empleo del vocablo *homología* como sinónimo de *similitud*. Sin embargo, en el contexto de la Evolución Molecular estos términos adquieren un significado más preciso. Se les llama homólogas a aquellas proteínas que están emparentadas desde un punto de vista evolutivo. Las proteínas homólogas generalmente conservan evidencias de su parentesco en las secuencias primarias, manteniendo cierto nivel de similitud compartida entre las mismas. El grado de similitud entre las secuencias de proteínas homólogas dependerá, entre otros factores, de cuán reciente sea la divergencia a partir del gen codificante ancestral y del nivel de conservación de la función entre las distintas proteínas durante el proceso evolutivo.

Una molécula cuya secuencia cambia al azar a través del tiempo manteniendo constante su función puede considerarse como un cronómetro; cuanto

mayor sea la variación acumulada por mutaciones entre dos secuencias homólogas, mayor será el tiempo transcurrido desde su divergencia. De esta forma, aplicando los algoritmos adecuados a las secuencias de proteínas homólogas, es posible vislumbrar la historia evolutiva de las mismas. El concepto de *cronómetros moleculares*, es decir la propuesta de comparar secuencias primarias de proteínas con propósitos filogenéticos (154), encuentra una base racional en la teoría neutralista de la evolución molecular (155). Sintéticamente, la teoría neutralista afirma que la aparición de mutaciones ventajosas aceptadas por la selección natural puede despreciarse ya que son muy infrecuentes comparadas con las mutaciones neutrales. Bajo esta hipótesis los cambios observados entre secuencias de proteínas homólogas con función conservada son el resultado de sustituciones aleatorias que no otorgan ventajas selectivas, tal como requiere un cronómetro molecular. Si bien no existe entre los seres vivos una molécula que cumpla estrictamente con todos los requisitos de un cronómetro molecular, los métodos desarrollados para reconstruir una filogenia a partir de datos de secuencia permiten obtener buenos resultados con moléculas cuyas propiedades distan de la idealidad (156).

La primera etapa de este trabajo de Tesis consistió en el análisis de las secuencias de proteínas de FNR conocidas hasta la fecha mediante técnicas de Filogenia Molecular para investigar la evolución de esta enzima y la relación existente entre las variantes de FPR presentes en proteobacterias.

3.2 Resultados

3.2.1 Filogenia de ferredoxina-NADP⁺ reductasas plastídicas

La estrategia planeada para abordar el estudio evolutivo de FNR consistió en la construcción de un árbol filogenético basado en la comparación de todas las secuencias aminoacídicas disponibles para esta enzima, excluyendo a aquellas como la

adrenodoxina reductasa, que no pertenecen a la superfamilia FNR (sección 1.2.5.3, 82). Se realizaron búsquedas en las bases de datos biomoleculares como se describe en la sección 2.1.2 de Materiales y Métodos, y se obtuvieron secuencias provenientes de plantas, algas, cianobacterias (algas verdiazules) y proteobacterias (bacterias púrpura). Sin embargo, no fue posible realizar un análisis filogenético basado en el alineamiento múltiple de la totalidad de las secuencias debido a la divergencia encontrada entre las FNRs de proteobacterias y las plastídicas. Esta divergencia es consistente con las particularidades que presentan las estructuras tridimensionales conocidas de FNRs proteobacterianas (66, 67) respecto a las estructuras determinadas para FNRs de plantas y cianobacterias (59, 60). Por lo tanto se decidió analizar ambos grupos en forma independiente.

En la **Figura 3.1** puede observarse el alineamiento múltiple de 25 secuencias de FNRs plastídicas, totalizando 373 posiciones. En el alineamiento no se incluyeron los péptidos tránsito que direccionan a las FNRs de plantas y algas a plástidos, ni el dominio amino terminal adicional relacionado a los polipéptidos de unión a ficobiliproteínas que presentan las FNRs de cianobacterias (45). Las secuencias que comparten el mismo origen pero son codificadas por genes diferentes se identificaron con un número entre paréntesis seguido al nombre de la especie. Asimismo, se agregó el término *raíz* en el nombre de algunas secuencias de plantas para indicar que la isoenzima correspondiente se expresa en ese tejido en vez de hacerlo en hojas (**Figura 3.1**).

El árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento múltiple se esquematiza en la **Figura 3.2**, donde las FNRs de hojas, de raíces y de cianobacterias forman grupos monofiléticos con un soporte por remuestreo del 100%, entendiendo por *monofilético* al grupo formado por todos los descendientes de una única forma ancestral.

(continúa en la página siguiente)

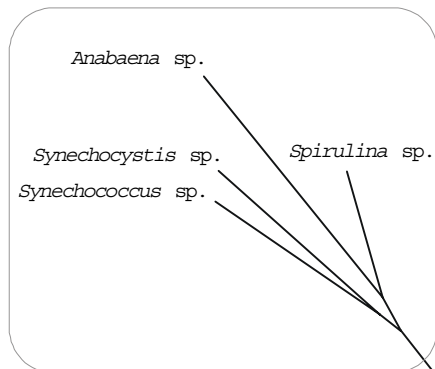
						190	200	
1	<i>Spinacia oleracea</i>		[PROTEINA: P00455]			NATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	1
2	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>		[PROTEINA: P41343]			NATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	2
3	<i>Glycine max</i>		[ADN: AI901249 AI736876 AI965612]			NATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	3
4	<i>Zea mays</i> (1)		[PROTEINA: BAA88237]			NATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	4
5	<i>Zea mays</i> (2)		[PROTEINA: BAA88236]			NATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	5
6	<i>Oryza sativa</i>		[PROTEINA: P41344]			NATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	6
7	<i>Nicotiana tabacum</i>		[PROTEINA: 004977]			NATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	7
8	<i>Lycopersicon esculentum</i>		[ADN: AW041481 AW037038 AW041137]			NATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	8
9	<i>Capsicum annuum</i>		[PROTEINA: CAB71293]			NATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	9
10	<i>Vicia fava</i>		[PROTEINA: P41346]			NATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	10
11	<i>Pisum sativum</i>		[PROTEINA: P10933]			NATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	11
12	<i>Zea mays</i>	(raíz)	[PROTEINA: S53305]			NATHIMIATG	TGVAPFRGYL	12
13	<i>Oryza sativa</i> (1)	(raíz)	[PROTEINA: 023877]			NATHIMIATG	TGVAPFRGYL	13
14	<i>Oryza sativa</i> (2)	(raíz)	[PROTEINA: P41345]			NATHIMIATG	TGVAPFRGYL	14
15	<i>Arabidopsis thaliana</i> (1)	(raíz)	[PROTEINA: AAF19753]			NATHIMIATG	TGVAPFRGYL	15
16	<i>Arabidopsis thaliana</i> (2)	(raíz)	[ADN: AC012477]			KATHIMIATG	TGVAPFRGYL	16
17	<i>Pisum sativum</i>	(raíz)	[PROTEINA: Q41014]			NATHIMIATG	TGVAPFRGYL	17
18	<i>Nicotiana tabacum</i>	(raíz)	[PROTEINA: 004397]			NATHIMIGTG	TGVAPFRGYL	18
19	<i>Cyanophora paradoxa</i>		[PROTEINA: Q00598]			SATIIMLG TG	TGIAPFRSFL	19
20	<i>Volvox carteri</i>		[PROTEINA: AAB40978]			NAPLICVATG	TGIAPFRSFL	20
21	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		[PROTEINA: P53991]			NAPLICVATG	TGIAPFRSFL	21
22	<i>Synechococcus</i> sp.		[PROTEINA: P31973]			DATVIMLG TG	TGIAPFRSFL	22
23	<i>Synechocystis</i> sp.		[PROTEINA: Q55318]			DANIVMLATG	TGIAPFRSFL	23
24	<i>Spirulina</i> sp.		[PROTEINA: P00454]			DATIIMATG	TGIAPFRSFL	24
25	<i>Anabaena</i> sp.		[PROTEINA: P21890]			EANVIMLG TG	TGIAPFRSFL	25

		210	220	230	240	250	260	270	280	
1	WKMFEEKH--	--DDYKFNGL	AWLFLGVPTS	SSLLYKEEFE	KMKEKAPDNF	RLDFAVSREQ	TNEKGEKMYI	QTRMAQYAVE		1
2	WKMFEEKH--	--DDYKFNGL	AWLFLGVPTS	SSLLYKEEFE	KMKEKAPENF	RLDFAVSREQ	TNEKGEKMYI	QTRMAQYDRE		2
3	WKMFEEKH--	--EDYKFNGL	AWLFLGVPTS	SSLLYKEEFE	KIQEKSPENF	RLDFAVSREQ	TNEKGEKMYI	QTRMAQYAAE		3
4	WKMFLEEHH--	--EDYKFNGL	AWLFLGVPTS	SSLLYKEEFE	KMKEXAPDNF	RLDFAVSREQ	TNAAGEKMYI	QTRMAEYREE		4
5	WKMFEEKH--	--DDYKFNGL	AWLFLGVPTS	SSLLYKEEFE	KMKERAPENF	RVDYAVSREQ	TNAAGERMYI	QTRMAEYKEE		5
6	WKMFEEKY--	--DDYKFNGL	AWLFLGVPTS	SSLLYKEEFE	KMKAKAPENF	RVDYAVSREQ	TNAQGEKMYI	QTRMAEYKEE		6
7	WKMFEEKH--	--EDYKFNGT	AWLFLGVPTS	SSLLYKEEFE	KMKEKAPENF	RLDFAVSREQ	TNEKGEKMYI	QTRMAQYAAE		7
8	WKMFEEKH--	--EDYKFNGT	AWLFLGVPTS	SSLLYKEEFE	KMKEKAPENF	RLDFAVSREQ	TNEKGEKMYI	QTRMAQYAAE		8
9	WKMFEEKH--	--DDYKFNGL	AWLFLGVPTS	SSLLYKEEFE	KMKEKAPENF	RLDFAVSREQ	TNEKGEKMYI	QTRMAQYAAE		9
10	WKMFEEKH--	--EDYKFNGL	AWLFLGVPTS	SSLLYKEEFE	KMKEKAPENF	RLDFAVSREQ	VNDKGEKMYI	QTRMAQYAAE		10
11	WKMFEEKH--	--EDYQFNGL	AWLFLGVPTS	SSLLYKEEFE	KMKEKAPENF	RLDFAVSREQ	VNDKGEKMYI	QTRMAQYAAE		11
12	RRMFMEDV--	--PNYRFGGL	AWLFLGVANS	DSLLYDEEFT	SYLKQYDPNF	RYDKALSREQ	KNRSGGKMYV	QDKIEEYSDE		12
13	RRMFMEDV--	--PSFKFGGL	AWLFLGVANT	DSLLYDEEFT	NYLQYQPDNF	RYDKALSREQ	KNKNGGKMYV	QDKIEEYSDE		13
14	RRMFMEDV--	--PKYRFGGL	AWLFLGVANT	DSLLYDEEFT	SYLKQYDPNF	RYDKALSREQ	KNKNGGKMYV	QDKIEEYSDE		14
15	RRMFMEV--	--PNKTFSGL	AWLFLGVANT	DSLLYDEEFT	KYLKDHDPNF	RYDKALSREQ	KNKNGGKMYV	QDKIEEYSDE		15
16	RRMFMEV--	--PNFKFDGL	AWLFLGVANS	DSLLYDEEFT	GYRKDYDPNF	RYDKALSREQ	KNKNGGKMYV	QDKIEEYSDE		16
17	RRMFMEV--	--PTFKFGGL	AWLFLGVANV	DSLLYDEEFT	KYLKDYDPNF	RYNRALSREQ	KNKNGGKMYV	QDKIEEYSDE		17
18	RRMFMEV--	--PT-KFNGL	AWLFLGVANT	DSLLYDEEFT	KYLDNDYGNF	RYDRALSREQ	KNKNGGKMYV	QDKIEEYSDE		18
19	RRMFEEH--	--ADYKFNGL	AWLFLGVPTS	STLLYREBLE	KMQKANPNNF	RLDYAISREQ	TDSKGEKMYI	QNRRIEYANE		19
20	RRCFMEV--	--PSYKFTGL	FWLFGVANS	DAKLYDEELQ	ALAKAYPSQF	RLDYALSREQ	KNRKGKMYI	QDKVEEYADE		20
21	RRCFIENV--	--PSYKFTGL	FWLFGVANS	DAKLYDEELQ	AIKAYPGQF	RLDYALSREQ	KNRKGKMYI	QDKVEEYADE		21
22	WRMFKEQH--	--EDYKFNGL	AWLFGVPTS	STLLYREBLE	KMQKANPNNF	RLDYAISREQ	TDSKGEKMYI	QNRRIEYANE		22
23	WRMFKEQH--	--EDYKFNGL	AWLFGVPTS	STLLYREBLE	KMQKANPNNF	RLDYAISREQ	TDSKGEKMYI	QNRRIEYANE		23
24	WRIFKEQH--	--EDYKFNGL	AWLFGVPTS	STLLYREBLE	KMQKANPNNF	RLDYAISREQ	TDSKGEKMYI	QNRRIEYANE		24
25	WRMFKAERA	ANPEYQFKGF	SWLVFGVPTT	PNILYKEELE	EIQKYDPDNF	RLTYAISREQ	KNPQGGKMYI	QDRVAEHADE		25

		290	300	310	320	330	
1	LWELKKDNT	YFYMCGLKGM	EKGIDDMVS	LAAAGIDWI	EYKRQLKKA	QWNVEVY	1
2	LWELKKDNT	YFYMCGLKGM	EKGIDDMVS	LAAAGIDWI	EYKRQLKKA	QWNVEVY	2
3	LWELKKDNT	YFYMCGLKGM	EKGIDDMVS	LAAAGIDWI	EYKRQLKKA	QWNVEVY	3
4	LWELKKDNT	YFYMCGLKGM	EKGIDDMVS	LAAAGIDWI	EYKRQLKKA	QWNVEVY	4
5	LWELKKDNT	YFYMCGLKGM	EKGIDDMVS	LAAAGIDWI	EYKRQLKKA	QWNVEVY	5
6	LWELKKDNT	YFYMCGLKGM	EKGIDDMVS	LAAAGIDWI	EYKRQLKKA	QWNVEVY	6
7	LWELKKDNT	YFYMCGLKGM	EKGIDDMVS	LAAAGIDWI	EYKRQLKKA	QWNVEVY	7
8	LWELKKDNT	YFYMCGLKGM	EKGIDDMVS	LAAAGIDWI	EYKRQLKKA	QWNVEVY	8
9	LWELKKDNT	YFYMCGLKGM	EKGIDDMVS	LAAAGIDWI	EYKRQLKKA	QWNVEVY	9
10	LWELKKDNT	YFYMCGLKGM	EKGIDDMVS	LAAAGIDWI	EYKRQLKKA	QWNVEVY	10
11	LWELKKDNT	YFYMCGLKGM	EKGIDDMVS	LAAAGIDWI	EYKRQLKKA	QWNVEVY	11
12	IFKLLDG-GA	HIYFCGLKGM	MPGIQDTLKR	VAERGESWE	QKLSQLKKNK	QWHVEVY	12
13	IFKLLDG-GA	HIYFCGLKGM	MPGIQDTLKR	VAERGESWE	QKLSQLKKNK	QWHVEVY	13
14	IFKLLDG-GA	HIYFCGLKGM	MPGIQDTLKR	VAERGESWE	QKLSQLKKNK	QWHVEVY	14
15	IFKLLDG-GA	HIYFCGLKGM	MPGIQDTLKR	VAERGESWE	QKLSQLKKNK	QWHVEVY	15
16	IFKLLDG-GA	HIYFCGLKGM	MPGIQDTLKR	VAERGESWE	QKLSQLKKNK	QWHVEVY	16
17	IFKLLDG-GA	HIYFCGLKGM	MPGIQDTLKR	VAERGESWE	QKLSQLKKNK	QWHVEVY	17
18	IFKLLDG-GA	HIYFCGLKGM	MPGIQDTLKR	VAERGESWE	QKLSQLKKNK	QWHVEVY	18
19	FWNMIQKNT	HYMFCGLKGM	EDGIQCCMED	IAKANGTWD	AVVGLKKEK	RWHVETY	19
20	IFDLLDN-GA	HYMFCGLKGM	MPGIQCCMED	IAKANGTWD	AVVGLKKEK	RWHVETY	20
21	IFDLLDN-GA	HYMFCGLKGM	MPGIQCCMED	IAKANGTWD	AVVGLKKEK	RWHVETY	21
22	LFEMIQKNT	HYMFCGLKGM	MPGIQCCMED	IAKANGTWD	AVVGLKKEK	RWHVETY	22
23	LWNLMQPKT	HYMFCGLKGM	MPGIQCCMED	IAKANGTWD	AVVGLKKEK	RWHVETY	23
24	LWELIQKNT	HYMFCGLKGM	MPGIQCCMED	IAKANGTWD	AVVGLKKEK	RWHVETY	24
25	LWELIQKNT	HYMFCGLKGM	MPGIQCCMED	IAKANGTWD	AVVGLKKEK	RWHVETY	25

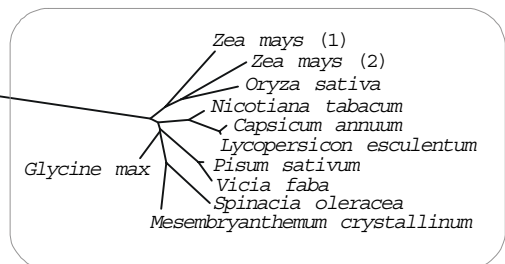
Figura 3.1 Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de ferredoxina-NADP⁺ reductasas, empleado para el análisis filogenético. Para cada secuencia se indica la numeración correlativa, el origen y los números de acceso en la base de datos GenBank.

CIANOBACTERIAS [Algas verdiazules]

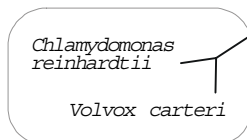


GLAUCOCISTOFITAS [Algas con cianelas]

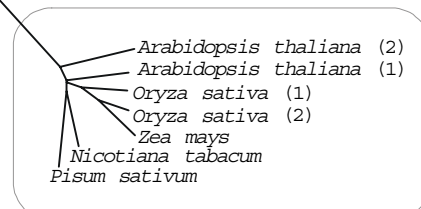
Cyanophora paradoxa



EMBRIOFITAS [Hojas de plantas superiores]



CLOROFITAS [Algas verdes]



EMBRIOFITAS [Raíces de plantas superiores]

0.5 sustituciones / sitio

Figura 3.2 Relaciones filogenéticas entre FNRs plastídicas basadas en la comparación de sus secuencias de aminoácidos. La longitud de cada rama es proporcional a la distancia evolutiva calculada, de acuerdo con la escala incluida en la figura. Los números adyacentes a las ramas indican la cantidad de árboles donde se observaron los dos grupos que la rama define, por cada 100 árboles obtenidos a partir de los datos remuestreados. Se recuadraron los grupos filogenéticos de mayor jerarquía. Los procedimientos computacionales empleados para la obtención del árbol se indican en la sección 2.1.3 de Materiales y Métodos.

Cyanophora paradoxa es una glaucocistofita, grupo formado por algas cuyos plástidos (cianelas) presentan características del endosimbionte cianobacteriano. La relación inferida entre la FNR de *Cyanophora paradoxa* y las FNRs de hojas mostró un bajo soporte estadístico (61%). La característica más destacable del árbol filogenético obtenido fue la inesperada relación de las FNRs de raíz con las FNRs de algas verdes.

3.2.2 Subtipos de ferredoxina-NADP⁺ reductasas proteobacterianas

La obtención de las secuencias de FNR proteobacterianas (FPRs) se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Todas las secuencias que se encontraron como producto de la búsqueda por similitud con la FPR de *Escherichia coli* resultaron ser de origen proteobacteriano. Las 23 secuencias halladas provinieron de 17 especies de proteobacterias, aunque cinco de estas especies aportaron dos secuencias de FPRs codificadas por genes diferentes. Debe destacarse que la base TIGR libera inmediatamente los datos de secuencia derivados de los proyectos de secuenciación de genomas completos actualmente en curso, sin una caracterización funcional o estructural de los posibles productos proteicos.

El alineamiento múltiple de las 23 secuencias analizadas totalizó 283 posiciones y se muestra en la **Figura 3.3**. El estudio de los últimos ocho residuos alineados en la región carboxilo terminal permitió la división de las FPRs en tres grupos, el primero conformado por las secuencias 1 a 9, el segundo por las secuencias 10 a 20 y el tercero por las secuencias 21 a 23. Dado que las estructuras tridimensionales de las FPRs de *Azotobacter vinelandii* y de *Escherichia coli* han sido resueltas (67, 66), se decidió adoptar a las mismas como referentes del grupo al que pertenecen. De esta manera, las FPRs del primer y segundo grupo constituyeron los subtipos *A. vinelandii*, y *E. coli*, respectivamente. El tercer grupo se denominó subtipo *A. actinomycetemcomitans*.

	100	110	120	130	140	150	160	170	
1	QHLKEGDELM	VS RKPTGTVL	TSDLL----	GKHYLLMSTG	TGLAPFMSLI	QDPEVYERFE	KVVLHVGVRV	VNELAYQQFI	1
2	QHLKEGDELM	VS RKPTGTVL	HDDL-----	GKHYLLYSTG	TGMAPFLSVI	QDPETYERYE	KVILVHGVWR	VSELAYADFI	2
3	QHLKEGDTTL	VS RKPVGTVL	VDDLK-----	GKHYLYFGTG	TGLAPFMSII	KDPEVYERFE	KVVLVHGVWR	ASELAYADFI	3
4	QHLKEGDTTL	VS RKPVGTVL	VDDLK-----	GKHYLYFGTG	TGLAPFMSII	KDPEVYERFE	KVILVHGVWR	ASELAYADFI	4
5	QHLKVGDDVL	IS KKP GTVL	AGDLN----	GKHYLLYSTG	TGIAPFLSIT	KDPEIYEQFE	KIILVHGVRY	KKDLAYYDRF	5
6	QHLKVGDEVL	IS KKP GTVL	AGDLN----	GKHYLLYSTG	TGIAPFLSIT	KDPEIYEQFE	KIILVHGVRY	KKDLAYYDRF	6
7	QLIQEGDEIL	L GKPTGTVL	LDADR-----	GKRLPLFGTG	TGLAPWLSVA	RDPDAYSRFE	RIVVAHVGRE	VKELAYRDLF	7
8	QKIKEGDEIL	LGRKPTGTVL	ADTL-----	GKRLPLLATG	TGLAPFLSII	RDPDIYDRFE	KIILVHVSRR	VVELAYYDDL	8
9	QHIKVGEQII	LR PKPVGTVL	IDALL-----	GKRLWFLATG	TGIAPFASLM	REPEAYEKFD	EVIMMHACRT	VAELEYGRQL	9
10	AALKPGDEVQ	VVSBAAGFFV	LDEVP-----	CETLWMLATG	TAIGPYLSIL	QLGKDLDRPK	NLVLVHAARY	AADLSYLPML	10
11	AALKLGDEVQ	VVSDAGFFV	LDEVP-----	CETLWMLATG	TAIGPYLSIL	QYGQDVARFK	NLVLVHAARF	AADLSYLPML	11
12	AALKPGDEVQ	VVSDAGFFV	LDEVP-----	CETLWMLATG	TAIGPYLSIL	QYGQDVTRFK	NLVLVHAARF	AADLSYLPML	12
13	AALKPGDEVQ	VVSDAGFFV	LDEVP-----	CETLWMLATG	TAIGPYLSIL	QYGQDVARFK	NLVLVHAARF	AADLSYLPML	13
14	A-LKAGDEVL	VVSBAAGFFV	LEEV-----	CDTLWMLATG	TALGPYLSIL	QEGQDLERNF	NLVLVHAVRY	AADLSYLPML	14
15	DQLSVGGEVM	ITKQAAGFFV	LEEIP-----	CDTLWMLATG	TAIGPYLSIL	QEGQDLERFK	HLVLVHAARF	AHDLSYLPML	15
16	YNLKSNDNLF	IKPSFGFTMT	LDEIP-----	N KTLWMLFATG	TGIGPYCSIL	QEYKNNRPF	NIILIHVARY	QNELTYLPLD	16
17	LHLAIGDEID	ITPTATGFFT	LDEI PKGELG	GRHLWFLATG	TAVGPFLSML	DTAEPQWRF	KIVLVGVGRE	AKDLAYLDKL	17
18	SRLREGDQLL	VDRQAQFGLT	LDRFV-----	GRDLWLLATG	TGVAPFVSIL	QDFEVWERFE	SIKLVYSVRE	SKELAYRELI	18
19	ERLQPGDALY	VEKKPFGFLT	IDRFA-----	GGDLLWLLASG	TGLSAYLSIL	RDPATWRAVD	RIILVHGVRS	AABELAYRDEI	19
20	ARLQPGDALY	VEKKPFGFLT	IDRFA-----	GGDLLWLLASG	TGLSAYLSIL	RDPATWRAVD	RIIIVHGVRX	XXXXXXYYXX	20
21	AKMQQGDITL	LDKNATGFL	PERFP-----	GKDLVMLCTG	SGIAPFLSIL	EQEPIQRQFD	TVNLIHSVSF	PEELIFNDRL	21
22	AKMQQGDITL	LDKNATGFL	PERFP-----	GKDLVMLCTG	SGIAPFLSIL	EQEPIQRQFD	TVNLIHSVSF	PEELIFNDRL	22
23	KQMAGDITLL	LEKKPVGFFT	VNRI P-----	GKELIILLATG	SGIAPFLSML	QSEEFWQKTD	KIVLVHSVSY	AADLVFEQYL	23

(continúa en la página siguiente)

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Figura 3.3 Alineamiento múltiple de secuencias aminoácidas de FNRs, empleado para el análisis filogenético. Para cada secuencia se indica la numeración correlativa, el origen, el subtipo (entre paréntesis), y la base de datos y número de acceso correspondientes. AV: subtipo *Azotobacter vinelandii*. EC: subtipo *Escherichia coli*. AA: subtipo *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

La clasificación de las FPRs basada en la secuencia de su extremo carboxilo terminal cobra sentido considerando la importancia estructural que revisten estos residuos. En la **Figura 3.4** se comparan las interacciones del FAD con su entorno aromático en las FNRs plastídicas y en los subtipos propuestos de FPR. En las FNRs de *Spinacia oleracea* y de *Anabaena* PCC7119, un bucle del dominio amino terminal provee una tirosina, estrictamente conservada en todas las secuencias de FNR plastídicas, que mantiene una interacción no polar con la parte adenina del grupo prostético. Ese bucle no está presente en las FPRs, ya que el FAD adopta una conformación plegada (sección 1.2.5.1, **Figura 1.6**). Sin embargo, la porción adenina del FAD mantiene una interacción de la misma naturaleza con los residuos aromáticos Trp248 en FPR de *Escherichia coli* y Phe255 en FPR de *Azotobacter vinelandii*. Tal como sucede en las FNRs plastídicas, la cara *re* de la isoaloxazina interacciona en FPR de *Escherichia coli* con una tirosina (Tyr247) mientras que en FPR de *Azotobacter vinelandii* esta interacción se efectúa con el residuo Ala254. Estudios de mutagénesis sitio dirigida han demostrado la participación del residuo equivalente en la FNR de *Pisum sativum* (Tyr308) en la estabilidad de la enzima (157), y en capítulos posteriores de esta Tesis se discutirá su función decisiva en la modulación de la afinidad por piridín nucleótidos (**sección 5.3.3**).

Como se aprecia en los alineamientos parciales de la **Figura 3.4**, todas las secuencias de FPR subtipo *E. coli* muestran una conservación estricta de los residuos Tyr247-Trp248. Lo mismo es válido para los residuos Ala254-Phe255 en las secuencias de FPR subtipo *A. vinelandii*, exceptuando la proveniente de *Caulobacter crescentus* que posee una valina en vez de fenilalanina. Además de las idiosincrasias mencionadas, en las FPRs subtipo *E. coli* el residuo Trp248 constituye el extremo carboxilo terminal, mientras que dentro del subtipo *A. vinelandii* las secuencias se extienden de dos a cinco

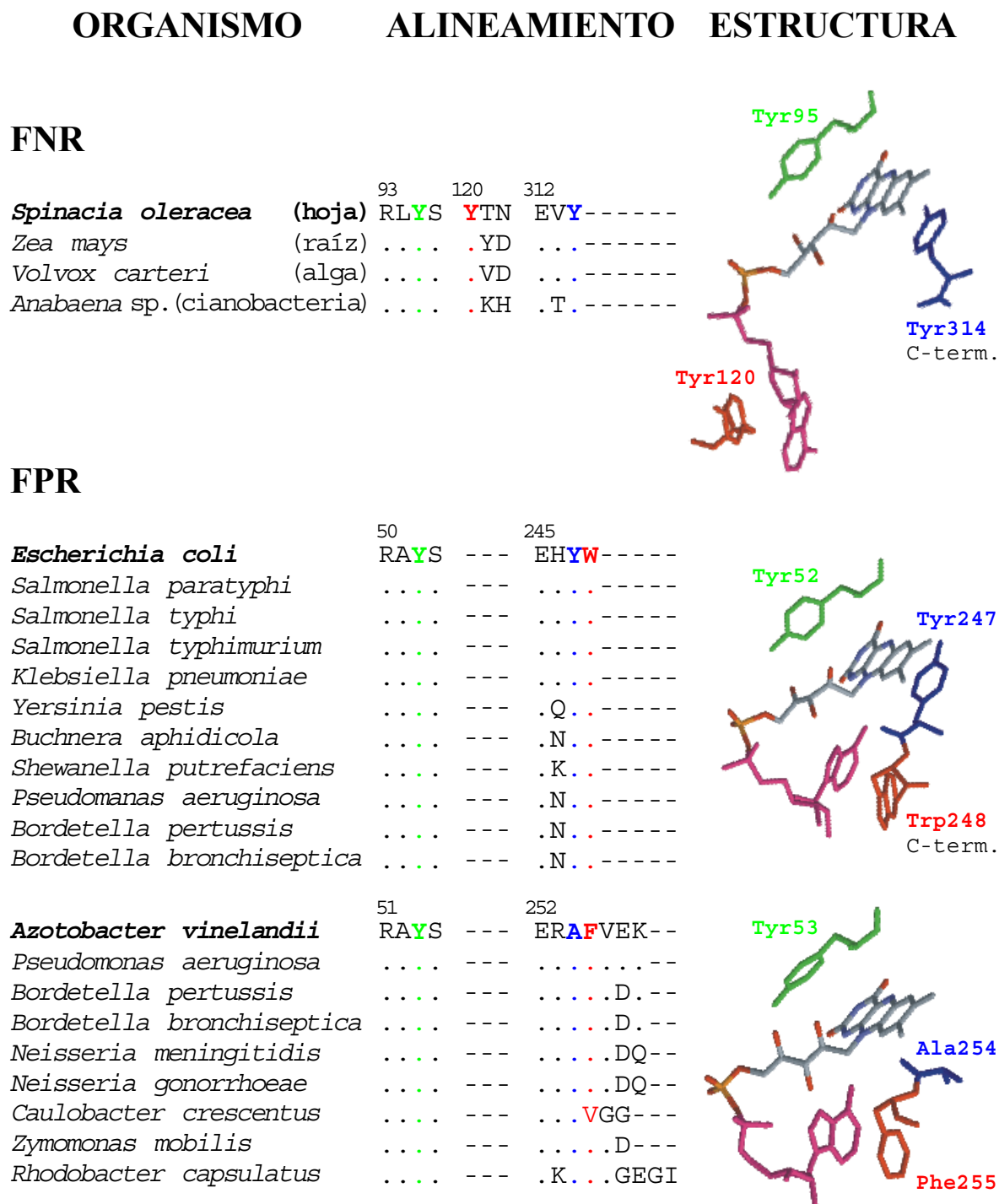


Figura 3.4 Comparación de FNR y FPR basada en estructura tridimensional. Se presenta un alineamiento parcial de las secuencias pertenecientes a cada grupo estructural, incluyendo los residuos aromáticos que interaccionan con el FAD, y un detalle de la estructura tridimensional prototípica. Los números sobre el primer aminoácido de cada segmento alineado corresponden a la posición relativa del residuo en la secuencia prototipo, indicada en negrita. En las estructuras tridimensionales y en los alineamientos se indica: en rojo el residuo aromático que interacciona con la parte adenina del FAD, en verde el residuo aromático que interacciona con la cara *si* de la isoaloxazina, y en azul el residuo que interacciona con la cara *re* de la isoaloxazina. C-term.: residuo carboxilo terminal.

residuos luego de la Phe255. Esta extensión carboxilo terminal se ha relacionado con la capacidad de la FPR de *Azotobacter vinelandii* de emplear como sustrato la ferredoxina tipo I (67, 158), ferrosulfoproteína también denominada ferredoxina 7Fe por contener un centro $[3\text{Fe-4S}]^{+/0}$ y otro $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ (159). Apoyando esta hipótesis, en proteobacterias que contienen FPRs subtipo *A. vinelandii* como *Pseudomonas aeruginosa*, *Caulobacter crescentus* y *Rhodobacter capsulatus*, se ha informado la presencia de ferredoxinas 7Fe (158). Asimismo, no se han encontrado ferredoxinas 7Fe, en especies de Proteobacteria que contengan únicamente FPRs subtipo *E. coli*.

3.2.3 Filogenia de ferredoxina-NADP⁺ reductasas proteobacterianas

Con el fin de analizar si la clasificación propuesta refleja la historia evolutiva de las FPRs se construyó un árbol filogenético basado en el alineamiento múltiple de la **Figura 3.3**. En el árbol consenso resultante (**Figura 3.5**) se observa que los subtipos *A. vinelandii* y *A. actinomycetemcomitans* formaron grupos monofiléticos con soporte estadístico del 100%. El subtipo *E. coli* también resultó monofilético según el árbol consenso, aunque en este caso el soporte estadístico fue 32%. Un análisis posterior de las topologías alternativas en los árboles provenientes de alineamientos remuestrados, reveló que el bajo soporte estadístico fue causado por la inclusión de las secuencias del subtipo *A. actinomycetemcomitans* en distintos puntos del subárbol formado por las FPRs subtipo *E. coli*. Para verificar si este era el único motivo del reducido intervalo de confianza que soportó al subtipo *E. coli*, se rehizo el análisis filogenético eliminando del alineamiento múltiple las secuencias del subtipo *A. actinomycetemcomitans*. Cuando se obtuvo el árbol consenso derivado de las secuencias 1 a 20, se observó una separación de las FPRs en los subtipos *A. vinelandii* y *E. coli*, avalada con un soporte estadístico del 100%.

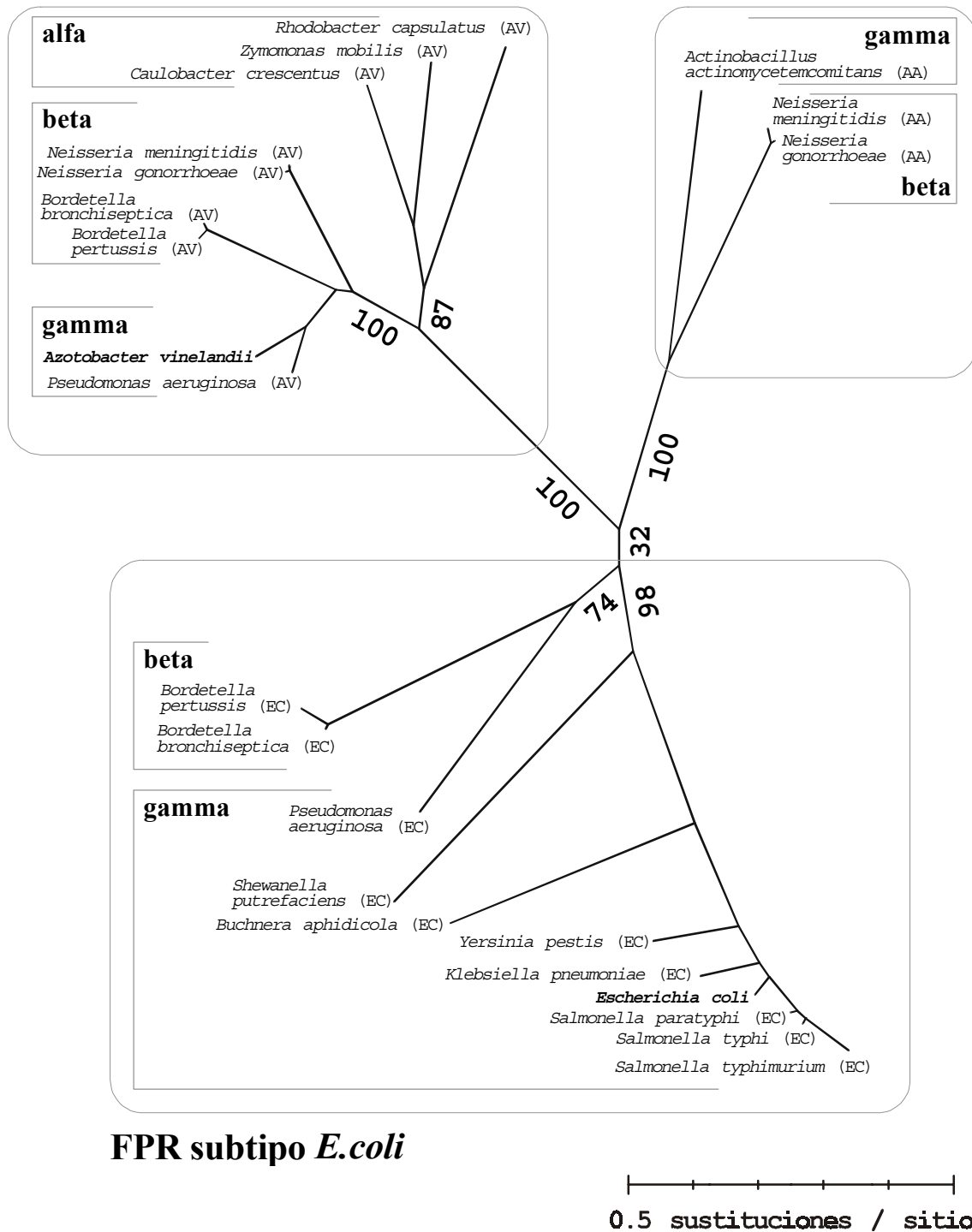
FPR subtipo *A. vinelandii***FPR subtipo *A. act.***

Figura 3.5 Relaciones filogenéticas entre FNRs proteobacterianas (FPRs) basadas en la comparación de sus secuencias de aminoácidos. La longitud de cada rama es proporcional a la distancia evolutiva calculada, de acuerdo con la escala incluida en la figura. Los números adyacentes a las ramas indican la cantidad de árboles donde se observaron los dos grupos que la rama define, por cada 100 árboles obtenidos a partir de los datos remuestreados. Se recuadraron los subtipos de FPR propuestos. Se indica con alfa, beta y gamma, la subdivisión de Proteobacteria correspondiente a cada organismo. Los procedimientos computacionales empleados para la obtención del árbol se indican en la sección 2.1.3 de Materiales y Métodos.

Además de la clasificación basada en subtipos de FPR, se ha indicado en el árbol filogenético la subdivisión de Proteobacteria a la que pertenece cada especie. Las subdivisiones de Proteobacteria dentro de cada subtipo constituyeron grupos monofiléticos, exceptuando la subdivisión beta en los subtipos *A. vinelandii* y *E. coli*. Más aún, la presencia de representantes de tres subdivisiones distintas en el subtipo *A. vinelandii*, permitió comprobar que la relación filogenética entre las mismas coincide con la obtenida a partir de otras macromoléculas (160).

3.3 Discusión

En este capítulo se estudió la evolución de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa mediante la construcción de árboles filogenéticos basados en las secuencias de aminoácidos de las enzimas plastídicas y proteobacterianas. No se han incluido en este análisis las adrenodoxina NADP⁺ óxido-reductasas, ya que presentan estructuras primarias y terciarias que demuestran un origen evolutivo completamente diferente al resto de las FNRs (sección 1.2.5.3, 82).

La clasificación de las FPRs según la estructura primaria de su extremo carboxilo terminal se sustentó inicialmente en la importancia de estos residuos en el mantenimiento de la función y la estructura terciaria de la enzima (**Figura 3.4**). Sin embargo, el análisis evolutivo basado en las secuencias aminoacídicas reveló que los subtipos de FPR se correspondieron con grupos filogenéticos claramente establecidos (**Figura 3.5**), brindando un soporte adicional a la clasificación propuesta. La validación estadística por remuestreo indicó que la separación entre los subtipos *A. actinomycescomitans* y *E. coli* no es tan definida como la de éstos con el subtipo *A. vinelandii*.

Los datos estructurales y funcionales disponibles indican un origen evolutivo común para las reductasas plastídicas y proteobacterianas. Sin embargo, la

divergencia exhibida entre ambos grupos hizo metodológicamente preferible emprender el estudio filogenético de cada linaje en forma independiente (**Figuras 3.2 y 3.5**). Los resultados de ambos análisis se integraron en un esquema global de la evolución de FNR presentado en la **Figura 3.6**. El modelo planteado explica la historia evolutiva del gen que codifica para FNR en consonancia con la filogenia establecida para los grupos taxonómicos que poseen esta enzima. El diagrama puede interpretarse como un *árbol de genes* resumiendo la filogenia de las FNRs plastídicas y las FPRs, inserto en un *árbol de organismos* que muestra las relaciones filogenéticas aceptadas entre los mismos según se han obtenido a partir de otras biomoléculas (160-164). Cabe destacar que el *árbol de genes* de la **Figura 3.6** posee una raíz a pesar de que los árboles primarios de las **Figuras 3.2 y 3.5** no la poseen. Se entiende por raíz de un árbol filogenético al nodo que representa el antecesor común de todos los organismos, genes o productos génicos analizados. Virtualmente todos los métodos de reconstrucción filogenética producen como resultado árboles sin raíz (165). Para enraizar un árbol, es decir para establecer como estado ancestral un nodo o un punto intermedio sobre una rama, debe emplearse información adicional como la proveniente del registro fósil, del análisis de genes duplicados muy tempranamente en la historia evolutiva de los organismos bajo estudio, o de la comparación con otros árboles que posean raíz. El *árbol de genes* de la **Figura 3.6** fue enraizado empleando esta última técnica.

Según el modelo propuesto, la primera duplicación génica estaría asociada al evento de especiación que dividió a las proteobacterias de las cianobacterias ancestrales. Las duplicaciones identificadas como D1 y D2 en la **Figura 3.6**, no relacionadas con fenómenos de especiación, serían anteriores a la radiación del grupo Proteobacteria y habrían dado origen a los tres subtipos de FPR. Las dos duplicaciones se representaron colapsadas en el mismo nodo, ya que con los datos disponibles no fue

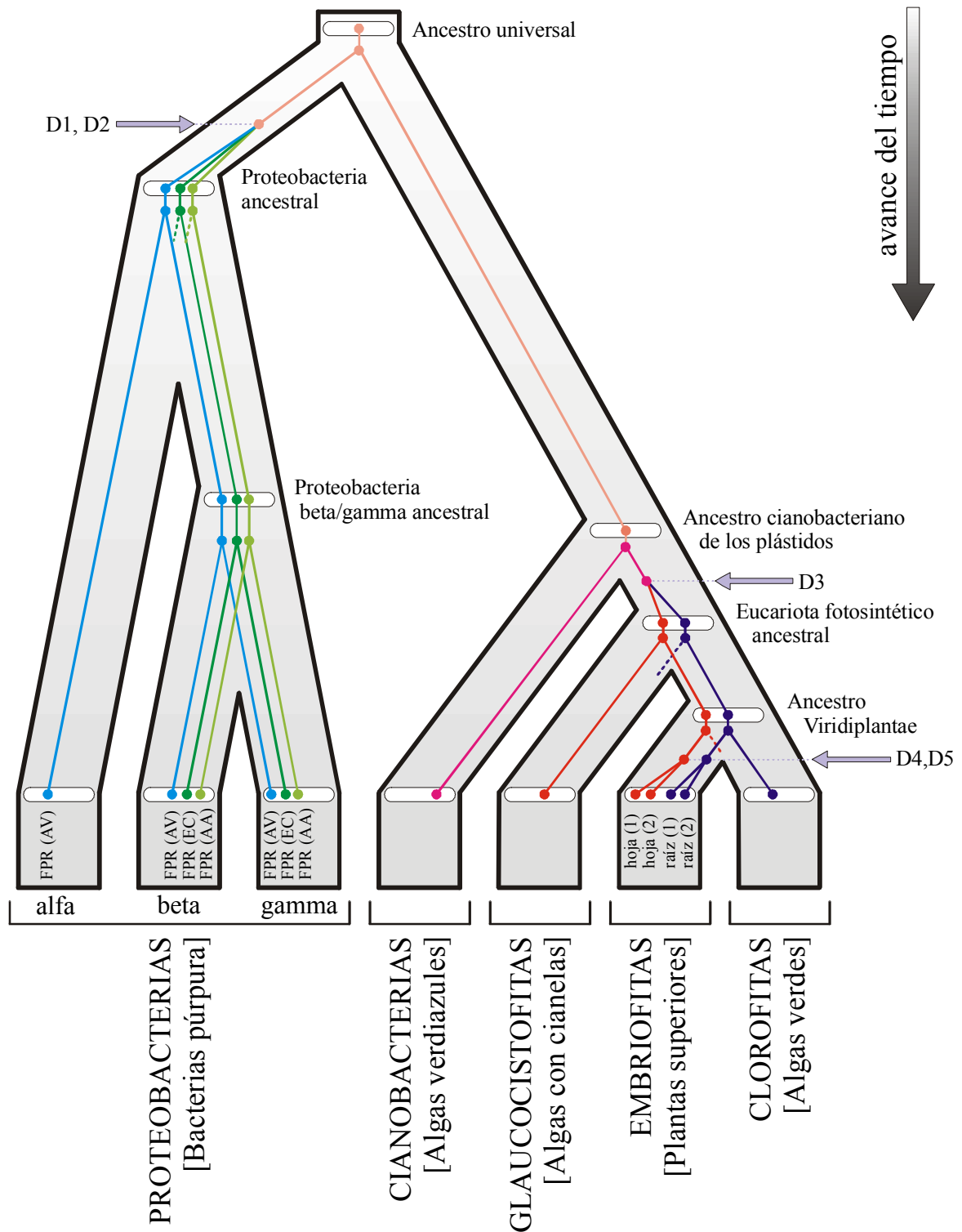


Figura 3.6. Evolución de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa. En círculos sólidos y líneas finas en color se muestra la historia evolutiva de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa. Las flechas rotuladas D1 a D5 indican eventos de duplicación génica. Las líneas de puntos indican pérdidas diferenciales de genes. En líneas negras gruesas se muestra el árbol filogenético de los grupos taxonómicos que poseen esta enzima, indicando con óvalos blancos los puntos nodales del mismo. En ambos árboles se respeta el orden temporal relativo de las especiaciones y duplicaciones génicas de acuerdo con la flecha de tiempo incluida en la figura.

posible establecer cual de los tres subtipos divergió más tempranamente. Hasta el presente, en las alfa proteobacterias sólo se encontraron FPRs subtipo *A. vinelandii*, a pesar del estado avanzado en el que se encuentran los proyectos de secuenciación de genomas completos de especies de este grupo taxonómico como *Rhodobacter capsulatus* y *Zymomonas mobilis*. Esto sugiere que el linaje de las alfa proteobacterias sufrió la pérdida diferencial de los genes del subtipo *E. coli* y *A. actinomycescomitans*, aunque sería necesario analizar un número mucho mayor de secuencias proteobacterianas para sostener esta hipótesis, secuencias que al presente no están disponibles. Si bien en la **Figura 3.6** se esquematizan las beta y gamma proteobacterias conteniendo los tres subtipos de FPR, debe aclararse que en ninguna de las especies analizadas se detectaron más de dos subtipos. Inclusive puede asegurarse que algunas especies como *Escherichia coli*, cuyo genoma se ha secuenciado completamente, sólo poseen uno de los subtipos.

En el árbol filogenético basado en las secuencias de ferredoxina-NADP⁺ reductasas plastídicas (**Figura 3.2**) las FNRs de hoja resultaron más cercanas a la de *Cyanophora paradoxa*, un alga glaucocistofita, que a las de clorofitas, en contradicción con la filogenia aceptada para estos grupos taxonómicos (163). Se encontró también que las FNRs de raíz resultaron más emparentadas a las de clorofitas que a sus contrapartes encontradas en hoja. Estas características pueden ser explicadas asumiendo la serie de eventos evolutivos que se describen a continuación. La primera duplicación en el linaje de las FNRs plastídicas, indicada como D3 en la **Figura 3.6**, generaría los genes tipo hoja y tipo raíz en el eucariota fotosintético ancestral, identificados en rojo y en azul respectivamente. Posteriormente se darían pérdidas diferenciales del gen tipo raíz en las glaucocistofitas y del gen tipo hoja en las clorofitas. Las dos isoformas de FNR encontradas en hojas de *Zea mays*, y en raíces de *Arabidopsis thaliana* y *Oriza sativa*

(**Figura 3.2**), se deben indudablemente a duplicaciones génicas ocurridas durante la radiación de las plantas superiores, identificadas como D4 y D5 en la **Figura 3.6**. Sin embargo, los datos disponibles fueron insuficientes para establecer cual de estas dos duplicaciones sucedió con anterioridad.

4 PARTICIPACIÓN DEL RESIDUO Y89 EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE FERREDOXINA-NADP⁺ REDUCTASA DE ARVEJA

4.1 Introducción

En todos los miembros de la superfamilia estructural FNR se encuentra un residuo aromático cercano a la cara *si* de la flavina, homólogo a la tirosina 89 en la secuencia de FNR de *Pisum sativum* (sección 1.2.6.2). La conservación absoluta de esta tirosina en todas las secuencias de FNRs conocidas hasta el presente (residuos en posición 108 en el alineamiento de la **Figura 3.1** y en posición 63 en el alineamiento de la **Figura 3.3**) y su proximidad a la isoaloxazina (59, 60, 66, 67) permiten inferir la importancia de este residuo. Sin embargo, a pesar de contarse actualmente con más de 10 estructuras tridimensionales correspondientes a diferentes variantes de FNR (**Tabla 1.2**), aún no se ha demostrado claramente cuál es la participación de esta tirosina en el mantenimiento de la estructura y la función de la enzima.

Con el fin de esclarecer este interrogante, se construyeron cuatro mutantes de FNR de *Pisum sativum* en las cuales se sustituyó el residuo tirosina en posición 89 por fenilalanina, triptofano, serina y glicina (141). En la mutante FNR Y89F se realizó un reemplazo por fenilalanina, cuya cadena lateral es idéntica a la del residuo silvestre pero carece del grupo hidroxilo. En la mutante FNR Y89W se realizó un reemplazo por triptofano, más voluminoso pero manteniendo el carácter aromático de la cadena lateral. El residuo serina en la mutante FNR Y89S provee una cadena lateral no aromática, pero con un grupo hidroxilo capaz de formar enlaces puente de hidrógeno. En la mutante FNR Y89G la tirosina se reemplazó por glicina, que sólo posee un hidrógeno como cadena lateral. Las cuatro proteínas mutantes se expresaron en *Escherichia coli*, fusionadas al extremo carboxilo terminal de los 16 aminoácidos iniciales de la β -galactosidasa. Estas proteínas recombinantes resultaron inestables y sólo la mutante

FNR Y89F pudo purificarse con buen rendimiento a partir de la fracción soluble del extracto bacteriano (141). Con el fin de superar este inconveniente las cuatro mutantes fueron subclonadas en el vector pGEX-3X para ser expresadas como proteínas de fusión con la glutatión *S*-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*.

En la segunda etapa de este trabajo de Tesis se caracterizaron las mutantes de GST-FNR en la tirosina en posición 89, con el fin de estudiar el papel desempeñado por este residuo en la estructura y función de la enzima.

4.2 Resultados

4.2.1 Contenidos de FAD en mutantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa en el residuo Y89 fusionadas a glutatión *S*-transferasa

La caracterización estructural de las mutantes de GST-FNR en el residuo Y89 se inició con la determinación de sus contenidos de FAD, es decir el valor promedio de moléculas de FAD por molécula de proteína para cada fusión, luego de su purificación a homogeneidad.

En primer lugar se efectuaron preparaciones de las proteínas de fusión GST-FNR silvestre, GST-FNR Y89F, GST-FNR Y89W, GST-FNR Y89S y GST-FNR Y89G como se describe en la sección 2.2.6 de Materiales y Métodos. Si bien todas las purificaciones se llevaron a cabo en idénticas condiciones, se extremaron los recaudos durante las cromatografías, prestando especial atención en mantener constantes factores como la duración de las distintas etapas, así como los flujos y volúmenes de solvente empleados durante las mismas. Estas precauciones resultan imprescindibles para la comparación de los resultados, en el caso en que las sustituciones provocasen una alteración en la constante de disociación del complejo $\text{FNR}_{\text{apoproteína}}/\text{FAD}$. Una vez obtenidas las distintas proteínas de fusión, se analizaron alícuotas de las preparaciones para determinar las concentraciones molares de FAD y de GST-FNR. La concentración

de proteína de fusión en cada preparación se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, tinción y digitalización de los geles, y densitometría de las bandas de proteína de fusión (sección 2.2.10). Cuando cada preparación se analizó en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, además de la banda asociada a GST-FNR se observaron bandas de menor peso molecular que corresponden a fusiones entre GST y formas truncadas de FNR (37). En estudios anteriores con GST-FNR mutantes, se comprobó que la remoción de los 20 residuos finales del extremo carboxilo terminal de FNR anulaba totalmente la capacidad de mantener unido el FAD a la proteína (127). Por lo tanto, para que el efecto de la sustitución en el residuo Y89 sobre el contenido de FAD no resultase enmascarado por la presencia de productos truncados de FNR, sólo se cuantificaron las fusiones entre GST y FNR completa.

En la **Figura 4.1.A** se muestran las bandas y las señales integradas correspondientes a las proteínas de fusión en estudio (calles 6 a 10) y a distintas cantidades de GST-FNR silvestre empleadas como patrón (calles 1 a 5). Para construir la curva patrón se sembraron los volúmenes indicados de una solución de GST-FNR silvestre 6,1 μM dosada por espectrofotometría ($\epsilon_{460} = 9,69 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). En la **Figura 4.1.B** se detallan las concentraciones de proteína de fusión estimadas mediante interpolación en la curva patrón, y las concentraciones de FAD determinadas por espectrofluorometría a partir de alícuotas de las respectivas preparaciones (sección 2.3.3). El contenido de FAD para cada forma de GST-FNR se calculó como el cociente entre la molaridad del FAD y la molaridad de la proteína de fusión. Como se observa en la **Figura 4.1.B** el contenido de FAD no difirió significativamente de 1 en la fusión GST-FNR silvestre, y resultó superior a 0,5 en las mutantes donde el residuo en posición 89 mantuvo el carácter aromático de la cadena lateral. Las sustituciones no

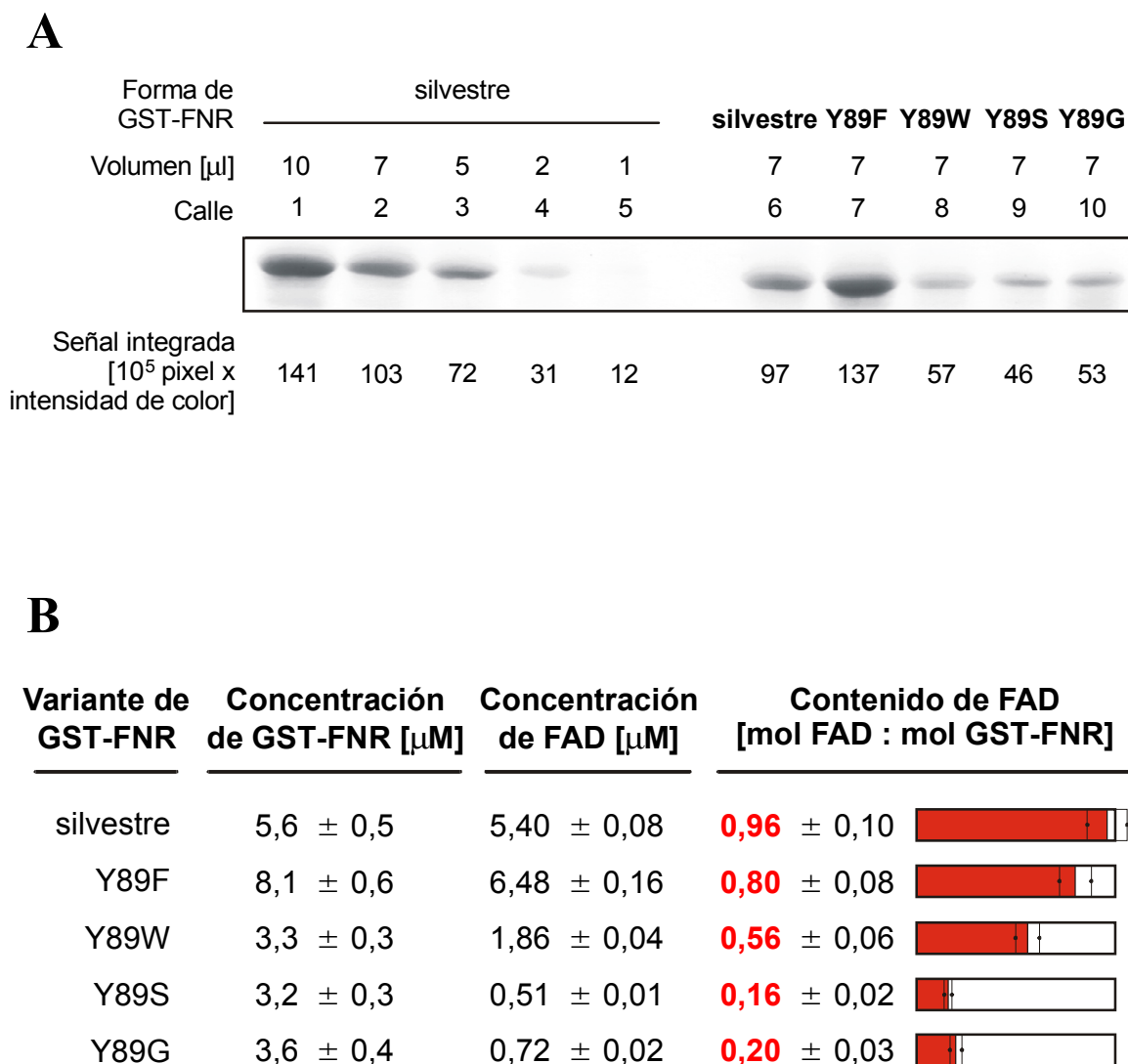


Figura 4.1 Contenidos de FAD en mutantes de GST-FNR en el residuo Y89. **A**, Determinación de la concentración de GST-FNR en cada preparación. Se muestra el resultado del análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y tinción con colorante Coomassie Blue, de alícuotas de cada preparación y de una curva patrón con GST-FNR silvestre 6,1 μ M. Se detallan los valores de las señales integradas de cada banda, resultado del análisis densitométrico del gel digitalizado. A cada intensidad de color se le asignó un entero entre 0 (blanco) y 255 (negro). **B**, Contenido promedio de FAD por molécula de apoproteína. La concentración de GST-FNR en cada preparación se determinó por interpolación en la curva patrón. La determinación de FAD se explica con detalle en el texto. El contenido de FAD se calculó como el cociente entre la molaridad del FAD y la molaridad de GST-FNR. Cada estimación se informa como el valor medio de tres repeticiones, seguido del error estándar. En el gráfico de barras se representa en rojo el valor medio del contenido de FAD estimado y en líneas finas el intervalo de \pm el error estándar.

aromáticas tuvieron un efecto más marcado sobre el contenido de FAD, indicando que al menos el 80 % de las fusiones se encontraría con FNR en su forma de apoproteína.

4.2.2 Proteólisis limitada con termolisina de mutantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa en el residuo Y89 fusionadas a glutatión *S*-transferasa

Con el fin de profundizar la caracterización estructural de las mutantes de GST-FNR en el residuo Y89 se realizaron ensayos de proteólisis limitada con termolisina (sección 2.3.4). En primer lugar se trataron 20 µg de cada fusión completa de FNR mutante y de GST-FNR silvestre con 2 µg de proteasa Xa durante una hora a 25°C, en un medio conteniendo NaCl 100 mM, CaCl₂ 1 mM y Tris-HCl 50 mM a pH 8,0. Luego se incrementó la concentración de CaCl₂ hasta 5 mM, se agregaron 2 µg de termolisina, se tomaron alícuotas a distintos tiempos que fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa y se inmunorrevelaron empleando anticuerpos antiFNR (sección 2.2.11).

La calle 1 de cada membrana representada en la **Figura 4.2** corresponde a la muestra antes del tratamiento con la endoproteasa Xa. Además de la banda de GST-FNR, en todas las variantes analizadas se observaron bandas inmunorreactivas de menor peso molecular que corresponden a fusiones entre GST y formas truncadas de FNR (37). La calle 2 de cada membrana corresponde a la muestra después del tratamiento con la endoproteasa Xa. En todos los casos el tratamiento fue suficiente para escindir completamente las fusiones, lo que resultó en la aparición de bandas inmunorreactivas correspondientes a formas de peso molecular igual o inferior al de FNR. En las calles 3 a 11 se aprecia el efecto del tratamiento de las muestras con termolisina a tiempos crecientes. La forma silvestre y las mutantes FNR Y89F y FNR Y89W, mostraron un núcleo resistente al ataque proteolítico aún luego de más de cuatro horas de incubación

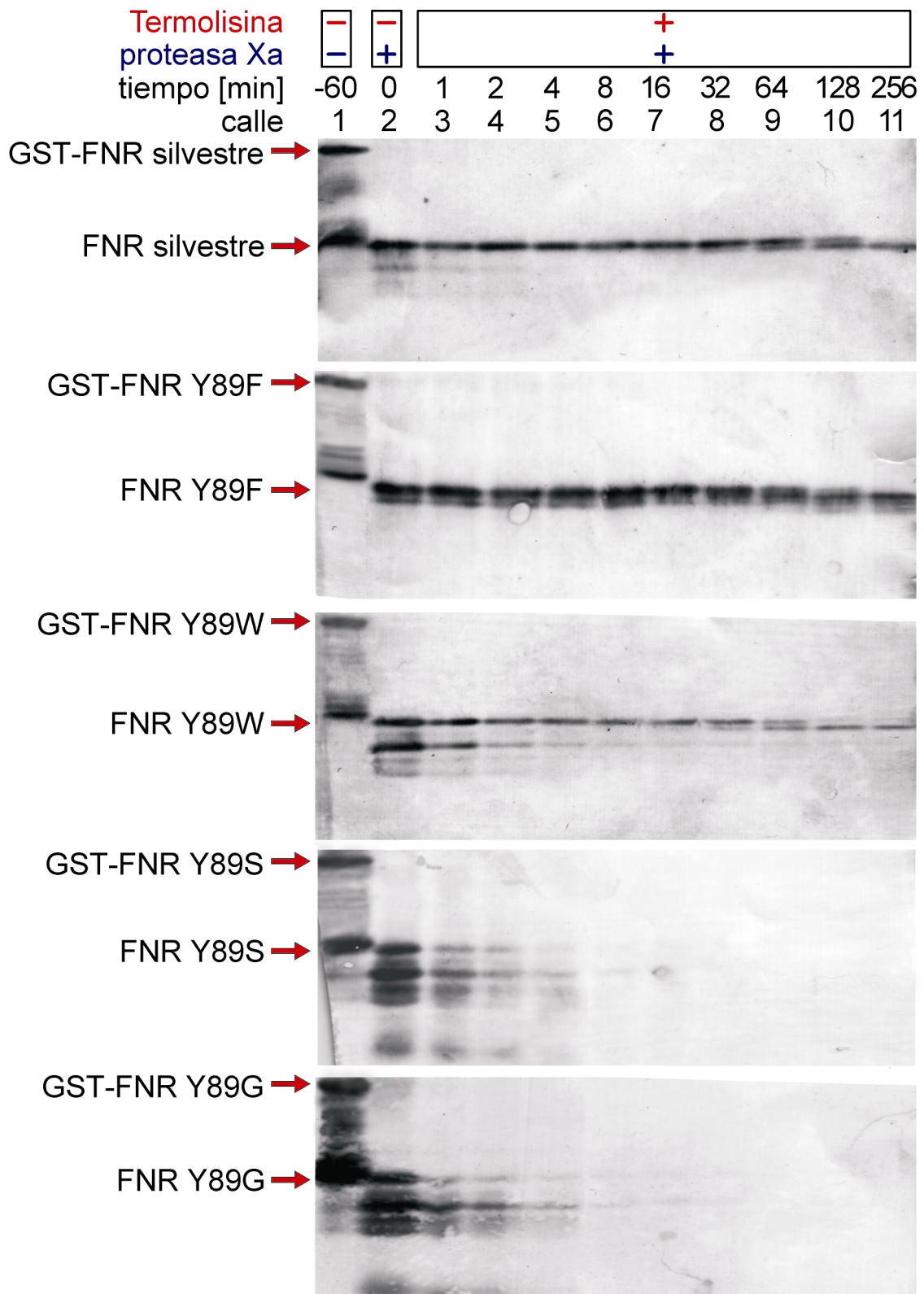


Figura 4.2 Proteólisis limitada de GST-FNR. Las mutantes de GST-FNR en el residuo Y89 y la fusión GST-FNR silvestre se sometieron a digestión con proteasa Xa y luego a proteólisis con termolisina. Se analizaron alícuotas a distintos tiempos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y posterior transferencia e inmunorreveado con antiFNR, según se detalla en el texto. Cantidad de fusión completa sembrada por calle: 0,2 µg para GST-FNR silvestre, GST-FNR Y89F y GST-FNR; 0,4 µg para GST-FNR Y89S y GST-FNR Y89G.

(calle 11). Por el contrario, a pesar de haberse sembrado el doble de proteína, no se detectaron bandas inmunorreactivas al cabo de 32 min para FNR Y89S (calle 8) o de 16 min para FNR Y89G (calle 7), indicando que el tratamiento resultó suficiente para proteolizar totalmente a estas mutantes.

4.2.3 Espectros de absorción electrónica de mutantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa en el residuo Y89

El siguiente paso en el estudio de las mutantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa en el residuo Y89 fue la caracterización de sus formas no fusionadas a GST. Con este fin se decidió escindir las fusiones y purificar a homogeneidad cada variante de FNR libre de GST (sección 2.2.7). Luego del tratamiento de las fusiones con proteasa Xa se observó la presencia de agregados insolubles que resultaron más abundantes en las variantes con menor contenido de FAD. Las mutantes FNR Y89F y FNR Y89W pudieron purificarse, aunque los rendimientos de las preparaciones resultaron menores a los obtenidos con la enzima silvestre. Sin embargo, no fue posible recuperar las mutantes FNR Y89S y FNR Y89G en forma soluble.

En la **Figura 4.3** se muestran los espectros de absorción electrónica de las mutantes FNR Y89F y FNR Y89W purificadas a homogeneidad, comparados con el de la enzima silvestre. Los coeficientes de extinción se obtuvieron por cuantificación espectrofotométrica del FAD extraído de la holoproteína (sección 2.3.5). Los espectros de las mutantes resultaron similares al de la enzima silvestre, con incrementos en los coeficientes de extinción a 384 y 461 nm para FNR Y89F y a 385 nm para FNR Y89W. Como se observa en el recuadro de la **Figura 4.3**, los máximos de absorción de las mutantes no difirieron más de 1 nm con respecto a los máximos de absorción de FNR silvestre.

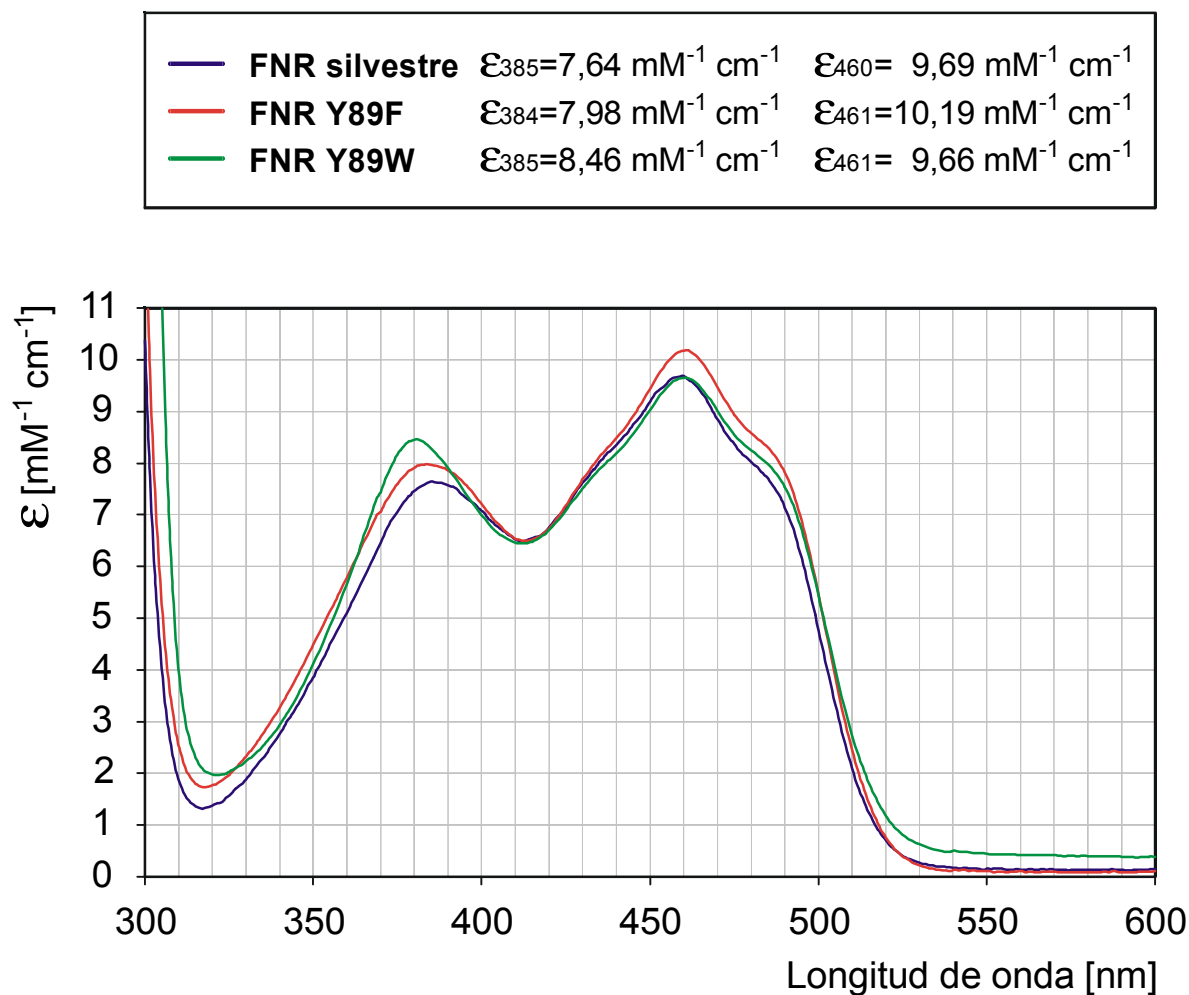
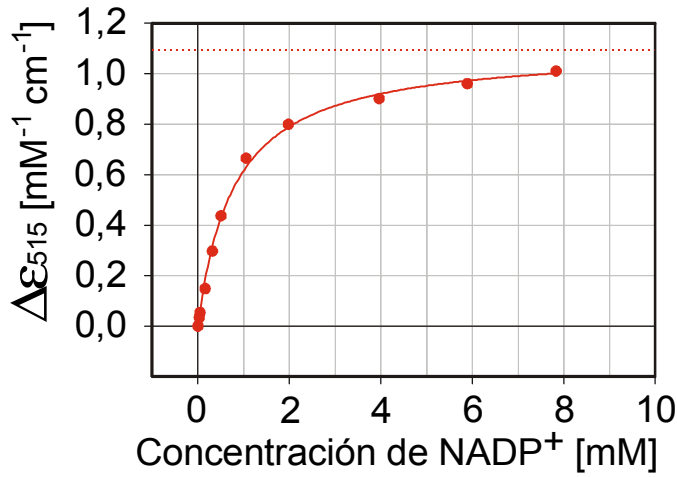


Figura 4.3 Espectros de absorción electrónica de FNR silvestre, FNR Y89F y FNR Y89W. Los espectros se determinaron a 20°C en celdas de 1 cm de paso conteniendo la flavoproteína a una concentración de 50 a 70 μM en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0. Los coeficientes de extinción se determinaron como se describe en la sección 2.3.5 de Materiales y Métodos.

4.2.4 Interacción de mutantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa en el residuo Y89 con NADP⁺

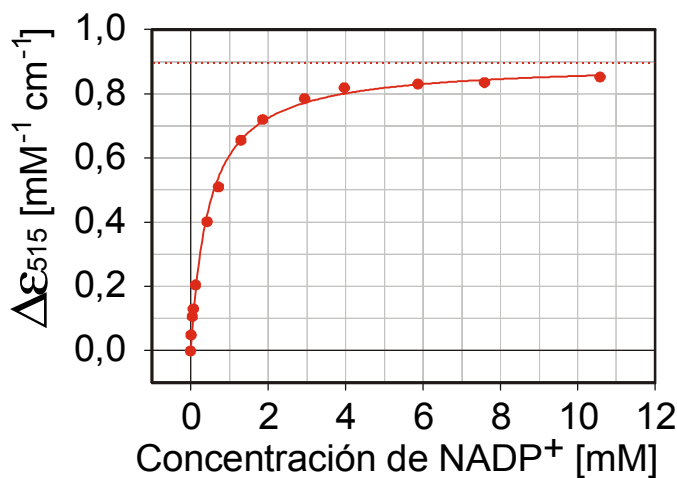
La interacción de FNR silvestre, FNR Y89F y FNR Y89W con NADP⁺ se investigó registrando los cambios en el espectro de absorción electrónica de la flavoproteína. Aunque la interacción de FNR con piridín nucleótidos ocasiona un corrimiento del espectro hacia el rojo, con perturbaciones en diferentes regiones del espectro diferencial, el cambio en torno a 515 nm resulta particularmente informativo. Es aceptado que la intensidad del pico en la región de 515 nm en el espectro diferencial de los complejos se correlaciona con la extensión de la interacción del anillo de nicotinamida con la cara *re* de la isoaloxazina en el sitio activo de la enzima (94, 122, 128, 129). Vale aclarar que aún en presencia de concentraciones saturantes de NADP⁺, el sitio activo de FNR silvestre no está completamente ocupado por la porción nicotinamida del sustrato. Como se explica en el siguiente capítulo de esta Tesis, la cara *re* de la isoaloxazina no es ocupada 100 % del tiempo por la nicotinamida debido a que la cadena lateral de Y308 compite por la misma ubicación. De esta forma los experimentos de titulación de FNR con NAD(P)⁺, además de proveer información acerca de la afinidad global por el ligando, permiten inferir en que medida se enfrenta la parte nicotinamida del NAD(P)⁺ con la isoaloxazina.

En la **Figura 4.4** se representan las titulaciones de FNR Y89F y FNR Y89W con NADP⁺ y los parámetros estimados luego del ajuste de los datos a la ecuación teórica para un modelo 1:1, es decir, de unión de un ligando a un sitio único en la enzima (sección 2.3.6). Los parámetros de la enzima silvestre de arveja determinados en las mismas condiciones ($K_d^{\text{NADP}^+} = 9 \mu\text{M}$, $\Delta\epsilon_{515} \text{ máximo} = 0,559 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) resultaron similares a los de la enzima de espinaca ($K_d^{\text{NADP}^+} = 14 \mu\text{M}$, $\Delta\epsilon_{515} \text{ máximo} = 0,789 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (91, 166). Los datos representados en las **Figura 4.4.A** y **4.4.B** indican que

A**FNR Y89F**

$\Delta\epsilon_{515}$ máximo =
 $1,094 \pm 0,020$ [mM⁻¹ cm⁻¹]

$K_d^{NADP^+}$ =
 $0,787 \pm 0,052$ [mM]

B**FNR Y89W**

$\Delta\epsilon_{515}$ máximo =
 $0,899 \pm 0,013$ [mM⁻¹ cm⁻¹]

$K_d^{NADP^+}$ =
 $0,472 \pm 0,032$ [mM]

Figura 4.4 Afinidad de FNR Y89F y FNR Y89W por NADP⁺. Representación del coeficiente de extinción diferencial en la región de 515 nm ($\Delta\epsilon_{515}$) de los espectros diferenciales de FNR debidos a la unión de NADP⁺ a la concentración indicada. Las líneas de puntos cruzan el eje de $\Delta\epsilon_{515}$ en el valor estimado de $\Delta\epsilon_{515}$ máximo. Las condiciones experimentales y el procesamiento de los datos se detallan en la sección 2.3.6 de Materiales y Métodos. En los recuadros se informan los valores estimados \pm el error estándar, de la constante de disociación del complejo FNR/NADP⁺ ($K_d^{NADP^+}$) y del $\Delta\epsilon_{515}$ máximo. **A**, FNR Y89F. **B**, FNR Y89W.

la afinidad por NADP^+ disminuyó unas 80 veces en la mutante FNR Y89F ($K_d^{\text{NADP}^+} = 0,79 \text{ mM}$) y más de 50 veces en FNR Y89W ($K_d^{\text{NADP}^+} = 0,47 \text{ mM}$).

En la **Figura 4.5** se graficaron los espectros diferenciales de FNR silvestre, FNR Y89F y FNR Y89W debidos a la unión de NADP^+ , en presencia de concentraciones saturantes del ligando. Los espectros de FNR Y89F y FNR Y89W se derivaron de los correspondientes a las condiciones de mayor concentración de NADP^+ en la **Figuras 4.4**. Para facilitar su comparación los espectros fueron escalados al 109 % y 105 % respectivamente, llevando los coeficientes de extinción diferenciales en la región de 515 nm al $\Delta\epsilon_{515}$ máximo estimado para cada forma de FNR. El espectro de la enzima silvestre se generó de la misma forma, escalando un 107 % el espectro diferencial obtenido en presencia de NADP^+ 200 μM . Descontando las diferencias en intensidad de las señales, el espectro diferencial de FNR Y89F resultó similar al de FNR silvestre, mientras que el espectro de FNR Y89W mostró ciertas particularidades en la región de 420-460 nm. El $\Delta\epsilon_{515}$ máximo de FNR Y89F ($\Delta\epsilon_{512} = 1,09 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) permite inferir un grado de ocupación del sitio activo por la nicotinamida 1,9 veces mayor que la esperada en la FNR silvestre de arveja ($\Delta\epsilon_{509} = 0,56 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Asimismo, la ocupación del sitio activo por la nicotinamida en FNR Y89W sería 1,6 veces mayor ($\Delta\epsilon_{514} = 0,90 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que la de su forma silvestre.

4.2.5 Parámetros cinéticos de la actividad diaforasa dependiente de NADPH de mutantes de ferredoxina- NADP^+ reductasa en el residuo Y89

Se estudió la cinética en estado estacionario de la reacción $\text{NADPH-K}_3\text{Fe(CN)}_6$ diaforasa catalizada por las mutantes de FNR en el residuo Y89. En la **Figura 4.6** pueden observarse los gráficos de las velocidades iniciales de reducción del $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ a distintas concentraciones del sustrato NADP^+ y los parámetros cinéticos

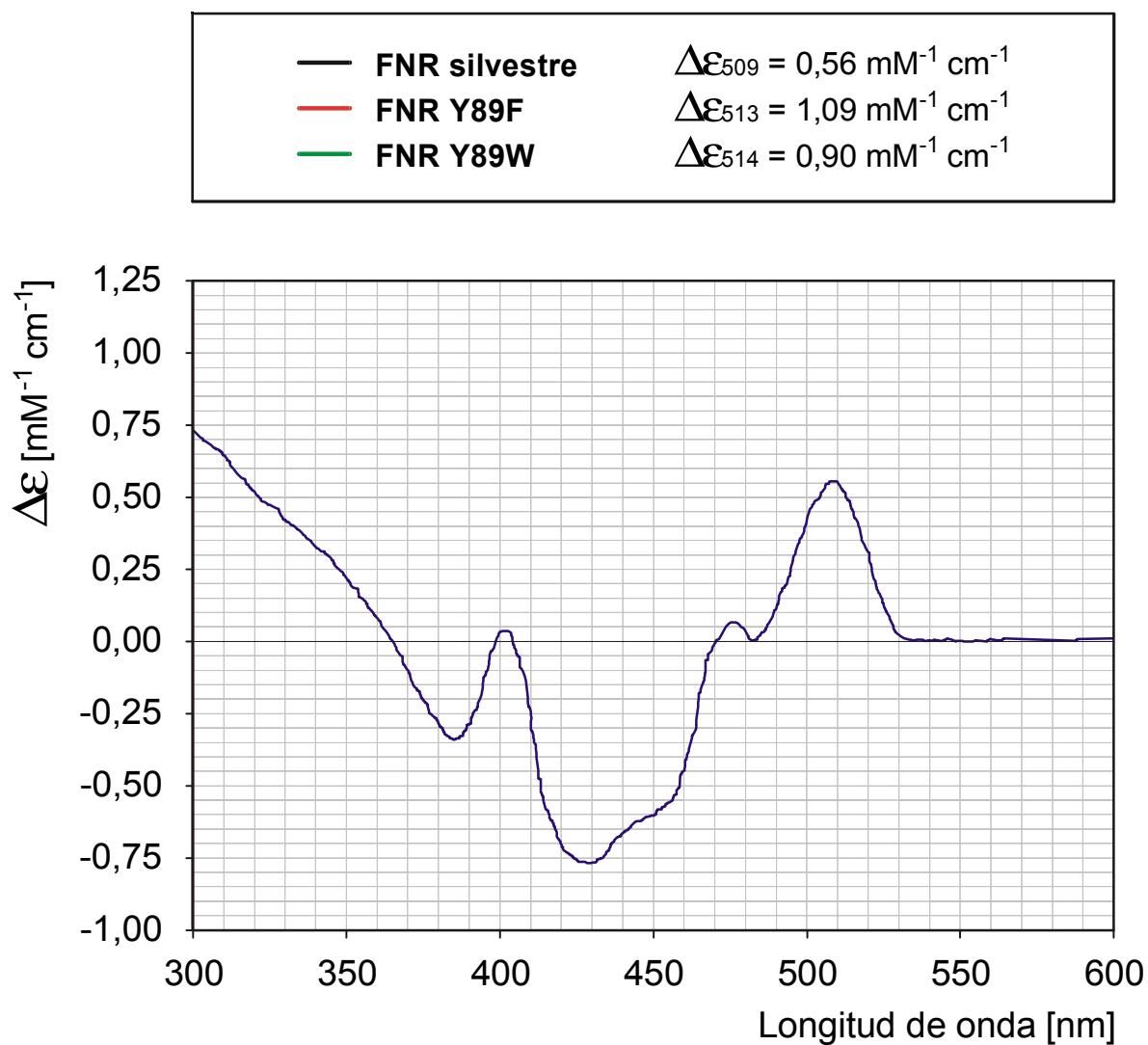


Figura 4.5 Espectros de absorción electrónica diferenciales de FNR silvestre, FNR Y89F y FNR Y89W debidos a la unión de NADP^+ . Cada espectro diferencial se calculó sustrayendo el espectro de la variante especificada de FNR y el espectro del NADP^+ , al espectro de FNR en presencia de concentraciones saturantes de NADP^+ . En el recuadro se indican los $\Delta\epsilon$ máximos en el entorno de 515 nm. Las condiciones adoptadas para la determinación de los espectros se detallan en el texto.

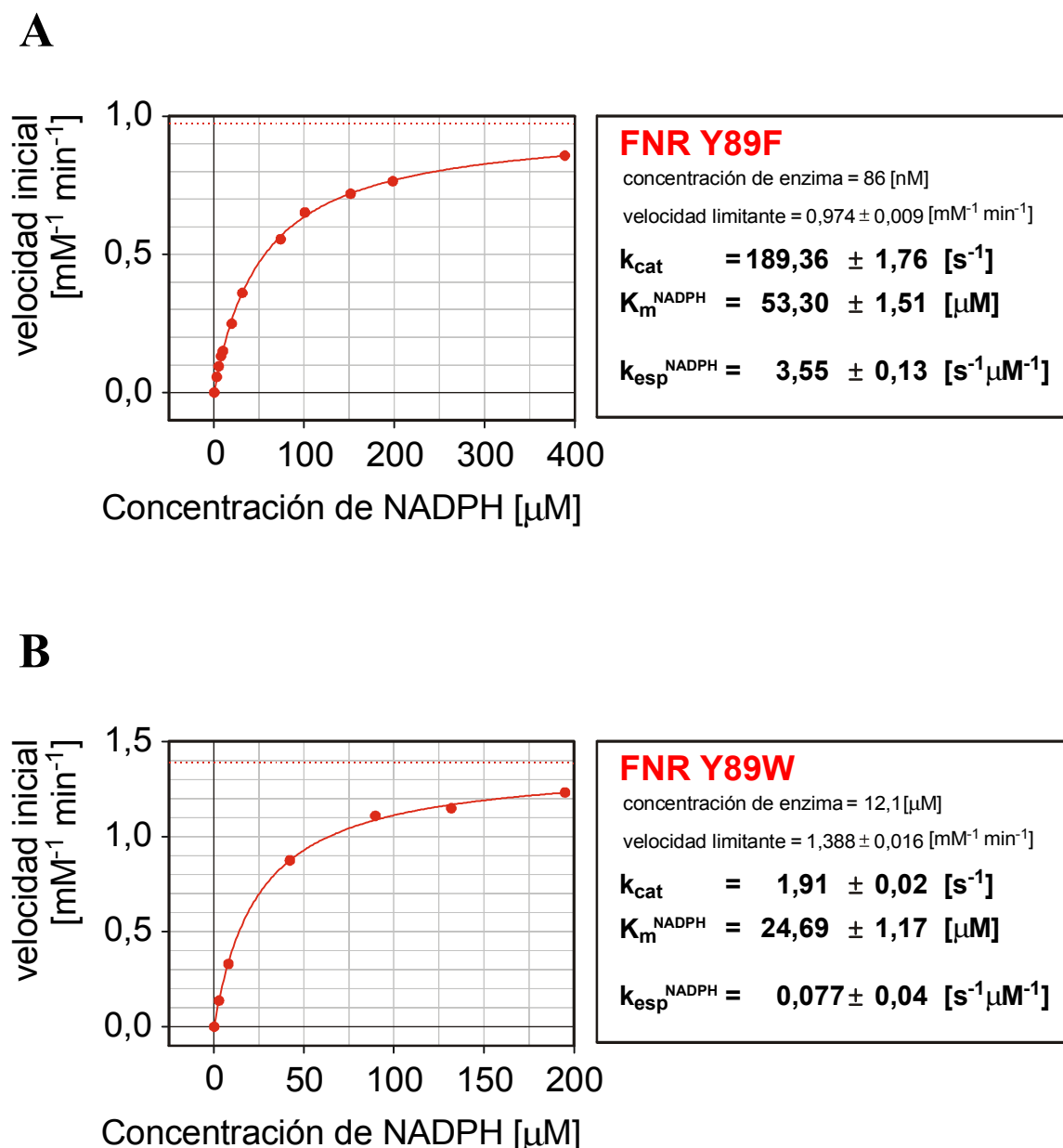


Figura 4.6 Estimación de los parámetros cinéticos de la reacción $\text{NADPH-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ diaforasa catalizada por mutantes de FNR en el residuo Y89. Se graficaron las velocidades iniciales de reducción de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en presencia de las concentraciones indicadas del sustrato NADPH. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se representaron sus valores medios. Las líneas de puntos cruzan el eje de velocidad inicial en el valor estimado de la velocidad limitante. Las condiciones experimentales detalladas y el análisis de regresión de los datos obtenidos se describen en la sección 2.3.2 de Materiales y Métodos. En los recuadros se informan los valores estimados \pm el error estándar, de la velocidad limitante y de la constante de Michaelis correspondiente al sustrato NADP^+ ($K_{\text{m}}^{\text{NADPH}}$). Siguiendo las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), se empleó el término "velocidad limitante" en vez del más usual "velocidad máxima". La constante catalítica (k_{cat}) se calculó como el cociente entre la velocidad limitante y la concentración molar de enzima. **A**, FNR Y89F. **B**, FNR Y89W.

estimados a partir de esos datos. Para la enzima silvestre en las mismas condiciones de medida se determinó una $k_{\text{cat}} = 490 \pm 4 \text{ s}^{-1}$ y una $K_{\text{m}}^{\text{NADPH}} = 24 \pm 0,7 \text{ }\mu\text{M}$, derivándose una constante de especificidad $k_{\text{esp}}^{\text{NADPH}} = 20,4 \pm 0,8 \text{ s}^{-1} \text{ }\mu\text{M}^{-1}$. La mutante FNR Y89F presentó una disminución de la k_{cat} y un aumento de la $K_{\text{m}}^{\text{NADPH}}$ moderados, cuyo cociente ($k_{\text{esp}}^{\text{NADPH}} = k_{\text{cat}} / K_{\text{m}}^{\text{NADPH}}$) implicó una constante de especificidad para NADPH casi seis veces menor que la de FNR silvestre. En cambio, la mutante FNR Y89W no mostró variación de la $K_{\text{m}}^{\text{NADPH}}$, pero las constantes catalíticas y de especificidad resultaron más de 250 veces menores que las de FNR silvestre.

Las preparaciones de GST-FNR mutantes mantenidas a 4°C no mostraron una disminución de la actividad específica apreciable en un lapso de una hora, el tiempo aproximado que se invirtió en la determinación de los parámetros cinéticos de cada enzima. Sin embargo, la mutante FNR Y89W resultó afectada por los ciclos de congelamiento y descongelamiento, observándose una reducción del 50 % de la actividad específica luego de cada descongelamiento.

4.3 Discusión

En este capítulo se estudió el efecto de diferentes sustituciones en el residuo tirosina 89 sobre la estructura y función de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa de arveja. La importancia de esta tirosina en la fijación del grupo prostético se analizó mediante la determinación del contenido de FAD en las mutantes fusionadas a GST. El contenido de FAD resultó menor a uno en las cuatro GST-FNR mutantes (**Figura 4.1.B**), indicando la existencia de GST-FNR_{apoproteína} en las preparaciones de fusión purificada. Debe destacarse que sólo se han obtenido preparaciones de FNR_{apoproteína} soluble luego de un tratamiento con CaCl₂ 2,5 M a 2°C en presencia de diversos agentes estabilizantes como DTT, glicerol y cloruro de guanidinio (167). La apoproteína pudo reconstituirse ante el agregado de un exceso de FAD, lo que permitió la determinación de la constante de

disociación del complejo FAD/FNR_{apoproteína} ($K_d^{FAD} = 3,9 \text{ nM}$). Sin embargo, el rendimiento global del proceso de reconstitución no alcanzó el 50 % de la holoproteína original debido a la desnaturalización de la apoproteína y a la formación de agregados insolubles (167). El estado apoproteína de las formas de FNR fusionadas a GST analizadas en este capítulo no presentaron esta fuerte tendencia a la agregación. En las GST-FNRs la fracción presente como GST-FNR_{apoproteína}, así como las fusiones de GST con formas truncadas de FNR (**Figura 4.2**, calle 1), probablemente se mantuvieron solubles gracias a la presencia del dominio GST, como ya había sido observado en trabajos anteriores (37). Luego de la escisión de las fusiones con proteasa Xa, estos productos formaron agregados insolubles justificando en parte el menor rendimiento obtenido durante la preparación de las mutantes comparado al logrado con la enzima silvestre.

Es importante recalcar que el protocolo de purificación de las distintas variantes de GST-FNR incluyó etapas en las que podría darse una pérdida del grupo prostético. Así, los repetidos cambios del solvente realizados durante una diálisis contribuyen a la eliminación de la fracción de FAD en equilibrio con la holoproteína. Análogamente, en los pasos de fijación y lavado de las fusiones unidas a glutatión agarosa, el FAD liberado en el equilibrio de disociación resulta continuamente desplazado de las cercanías de la apoproteína por el flujo del solvente. Estas condiciones aíslan artificialmente la reacción directa de disociación de GST-FNR_{holoproteína}, al impedir la reasociación del grupo prostético. Sin embargo, en la fusión GST-FNR silvestre no se encontraron evidencias de una liberación considerable del grupo prostético, ya que el contenido de FAD no difirió significativamente de 1 (**Figura 4.1.B**). Por lo tanto, la retención total del FAD en GST-FNR silvestre implica que la

constante de velocidad de la reacción directa de disociación del complejo holoproteína (k_1 en la **Ecuación 4.1**) es extremadamente baja:



El bajo valor de k_1 se ve reflejado en una K_d^{FAD} bajísima, aún cuando se la compara con las de otras flavoproteínas (167). Basándose en estas observaciones, el menor contenido de FAD de las mutantes podría deberse a un incremento en la k_1 que aumentaría la velocidad de liberación del grupo prostético. Asimismo, asumiendo que las sustituciones introducidas no han aumentado la velocidad de reasociación, se prevería un aumento en la K_d^{FAD} de las mutantes. Según esta hipótesis y debido a que las condiciones de purificación fueron idénticas para todas las fusiones, las reducciones en los contenidos de FAD se corresponderían con incrementos en las K_d^{FAD} . Como se explica al comienzo de esta sección, la determinación de la constante de disociación del complejo $\text{FNR}_{\text{apoproteína}}/\text{FAD}$ se basa en el análisis del proceso de reconstitución de la holoproteína a partir de la apoproteína y FAD libre (167). Desafortunadamente, la gran inestabilidad de las formas apoproteína de FNR Y89F y de FNR Y89W impidió la estimación de las K_d^{FAD} de estas mutantes.

Los contenidos de FAD menores a la unidad de las mutantes también podrían explicarse suponiendo defectos en la adquisición del grupo prostético durante la biosíntesis de la flavoproteína. En este caso el contenido de FAD coincidiría con la fracción de proteína que pudo incorporar correctamente el grupo prostético durante su plegamiento. Bajo esta hipótesis, el equilibrio de disociación de las distintas $\text{GST-FNR}_{\text{holoproteínas}}$ mutantes podría exhibir las mismas constantes de velocidad k_1 y k_{-1} que la fusión silvestre.

Los experimentos hasta aquí discutidos no permiten discernir entre las dos posibilidades anteriores o una combinación de las mismas, no obstante cuando se comparan los contenidos de FAD de las distintas mutantes de GST-FNR en Y89 (**Figura 4.1**), pueden extraerse algunas conclusiones acerca de la importancia de este residuo para la fijación del grupo prostético. Esta tirosina establece dos tipos de interacciones con el FAD, una de tipo π - π en la que estaría involucrado el anillo aromático de la cadena lateral del aminoácido y el anillo C de la isoaloxazina del FAD (sección **1.2.6.2**), y otra de tipo polar, más precisamente un enlace puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la cadena lateral del aminoácido y el grupo hidroxilo del C4 de la porción ribitilo del FAD (sección **1.2.6.1**). La mutante GST-FNR Y89F posee un residuo sustituto cuya cadena lateral es idéntica a la del residuo sustituido, excepto por la ausencia del grupo hidroxilo. Esta mutante exhibió un contenido de FAD relativamente cercano al de GST-FNR silvestre, indicando que las interacciones tipo puente de hidrógeno entre el residuo en posición 89 y el grupo prostético no son tan importantes para la fijación del FAD como las del tipo π - π . Favoreciendo esta hipótesis, en la mutante GST-FNR Y89W se determinó una relación entre FAD y fusión superior al 50 %, mientras que en las mutantes con sustituciones no aromáticas este valor no superó un 20 %. La sustitución de tirosina por triptofano pudo haber resultado menos conservativa que la sustitución por fenilalanina debido a que su cadena lateral es más voluminosa. Como se dedujo a partir de la comparación entre GST-FNR Y89F y GST-FNR silvestre, la interacción puente de hidrógeno, si bien menos importante que las interacciones π - π , contribuye en cierta medida a la estabilización del grupo prostético. Sin embargo, el contenido de FAD determinado para GST-FNR Y89S resultó aún menor que el de GST-FNR Y89G, sugiriendo que el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la serina no fue capaz establecer este tipo de interacción.

Los experimentos de proteólisis limitada de las distintas formas de FNR (**Figura 4.2**), permitieron inferir el grado de estructuración de las mutantes a partir de su sensibilidad al ataque proteolítico. Como ya ha sido descrito, la FNR silvestre mantuvo un núcleo resistente a la proteólisis aún luego de 4 hs de digestión (141, 146). Las mutantes con sustituciones aromáticas exhibieron un comportamiento similar al de la enzima silvestre, indicando pocas alteraciones en su conformación. Como la forma apoproteína de FNR es más susceptible a la proteólisis que la holoproteína, se decidió compensar el bajo contenido de FAD de las mutantes no aromáticas, sembrando el doble de proteína de fusión en los geles correspondientes a GST-FNR Y89S y GST-FNR Y89G. Sin embargo, no se detectaron formas resistentes a la proteólisis superada la media hora de tratamiento, indicando una alteración importante en la estructura de estas mutantes, que crearía nuevos sitios accesibles para la proteasa en el núcleo que resultó resistente en las otras variantes de la enzima.

La inestabilidad de GST-FNR Y89S y GST-FNR Y89G impidió su purificación en una forma no fusionada a GST. En cambio, las mutantes con sustituciones aromáticas se obtuvieron libres de GST, permitiendo una caracterización más profunda de las mismas. Los espectros de absorción electrónica de FNR Y89F y FNR Y89W no presentaron grandes diferencias respecto al de la proteína silvestre (**Figura 4.3**). Los espectros diferenciales debidos a la unión de NADP^+ de cada mutante permitieron estimar la constante de disociación del complejo FNR/ NADP^+ ($K_d^{\text{NADP}^+}$) y el $\Delta\epsilon_{515}$ máximo, que es proporcional a la extensión de la interacción entre el anillo de nicotinamida y la cara *re* de la isoaloxazina (**Figura 4.4**). Como se explica en el siguiente capítulo de esta Tesis, el $\Delta\epsilon_{515}$ máximo correspondiente al 100 % de ocupación de la cara *re* de la isoaloxazina por el anillo de nicotinamida de un piridín nucleótido, toma el valor $3,99 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (sección 5.2.3). Este valor se estimó a partir

del espectro diferencial correspondiente a la formación del complejo FNR Y308S/NADP⁺, ya que en esta mutante la nicotinamida del NADP⁺ puede ocupar plenamente el sitio liberado por la cadena lateral de la tirosina terminal sustituida (sección 1.2.7, sección 5.2.3). Empleando este $\Delta\epsilon_{515}$ como máximo absoluto puede estimarse el porcentaje de ocupación del sitio activo por la nicotinamida en las FNR mutantes. Se acepta que los porcentajes de ocupación no se refieren a una fracción estática en uno u otro estado, sino que representan el grado de desplazamiento del equilibrio dinámico en el cual la nicotinamida se encuentra interaccionando o no con la isoaloxazina (147).

En la **Figura 4.7** se representaron los parámetros estructurales y funcionales determinados para FNR Y89F y FNR Y89W, comparados con los de FNR silvestre. Ambas mutantes sufrieron una importante pérdida de afinidad por el sustrato fisiológico, con un aumento en la $K_d^{\text{NADP}^+}$ de unas 85 veces en FNR Y89F y 51 veces en FNR Y89W. Paradójicamente, a concentraciones saturantes de NADP⁺ la ocupación del sitio activo registró un aumento del 94 % en FNR Y89F y del 61 % en FNR Y89W. Analizando los espectros diferenciales de complejos entre FNR silvestre de espinaca y análogos que remedan distintas porciones del sustrato, se ha demostrado que la interacción con el NADP⁺ está gobernada por su parte 2'-P-AMP, sin que exista una contribución del anillo de nicotinamida a la energía de unión (91). Por lo tanto, no se esperarían diferencias notorias en la $K_d^{\text{NADP}^+}$ en mutantes de FNR que sólo dificultaran el correcto posicionamiento de la nicotinamida, manteniendo sin alteraciones la afinidad por la parte 2'-P-AMP. Corroborando esta hipótesis, la mutante de FNR de espinaca S96V mantuvo la misma $K_d^{\text{NADP}^+}$ que la enzima silvestre, aunque perdió casi completamente la capacidad de unir la porción nicotinamida (128). Por el contrario, como se estudia en el capítulo siguiente de esta Tesis, mutaciones en la tirosina terminal

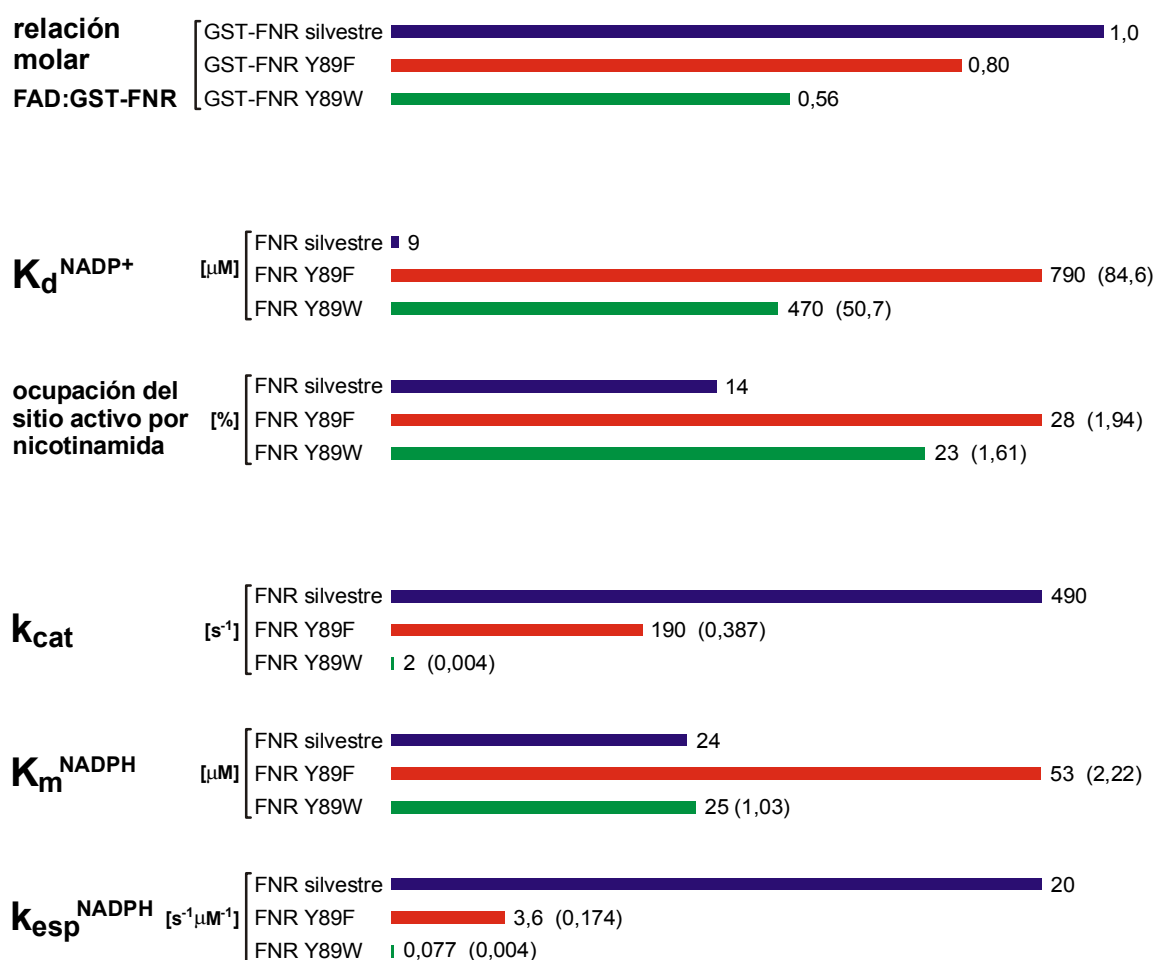


Figura 4.7 Comparación de las características estructurales y funcionales de las mutantes FNR Y89F y FNR Y89W con las de ferredoxina-NADP⁺ reductasa silvestre. Para cada parámetro se indica entre paréntesis la relación del valor determinado para FNR mutante respecto al de FNR silvestre.

de FNR de arveja que dejan accesible la cara *re* de la isoaloxazina provocaron tanto el aumento de la ocupación del sitio activo por nicotinamida, como la disminución en la $K_d^{NADP^+}$, indicando una estabilización del complejo entre la mutante de FNR y el $NADP^+$ (sección 5.2.3).

En vista de los antecedentes descriptos, los experimentos de fijación de $NADP^+$ a las mutantes FNR Y89F y FNR Y89W resultan en apariencia contradictorios. No era de esperar que una mutación en el residuo Y89, ubicado en las cercanías del sitio de unión para la nicotinamida, provocara una disminución en la afinidad por el $NADP^+$, y menos aún cuando la alteración en el sitio permite una unión más completa de la nicotinamida a concentraciones saturantes del sustrato. Sin embargo, estos resultados podrían explicarse si se admite un cambio conformacional ocasionado por la sustitución del residuo Y89 que hubiera facilitado la unión de la nicotinamida, pero que hubiese disminuido la afinidad por la porción 2'-P-AMP de modo de verse reducida la afinidad global por el $NADP^+$. El residuo 89 se ubica enfrente a la cara *si* de la flavina, por lo que bastaría suponer una alteración en el posicionamiento de la isoaloxazina que impidiera la ocupación de la cara *re* por la cadena lateral de la Y308, para esperar un aumento en la ocupación del sitio por la nicotinamida. La modificación de las características del sitio de unión para la parte 2'-P-AMP del sustrato causadas por la sustitución en Y89 podrían explicarse postulando un desplazamiento de la cadena lateral de la lisina en posición 110, inducido por el reposicionamiento de la isoaloxazina. Por homología con las estructuras conocidas de FNR, se acepta que el residuo K110 de la FNR de arveja (K116 en FNR de espinaca y R100 en FNR de *Anabaena*) interacciona tanto con el grupo prostético, como con el sustrato $NADP^+$ (41, 59, 60). Como se detalla en la sección 5.2.2 de esta Tesis la resolución de la estructura de FNR de arveja permitió verificar la veracidad de esta hipótesis. El residuo K110 interacciona con el FAD a

través del átomo de N de la cadena peptídica, formando un puente de hidrógeno con el átomo de O del C2 de la isoaloxazina. Además, el carbonilo de la cadena peptídica de K110 interacciona mediante una molécula de agua con el átomo de O del C2 de la isoaloxazina y con el grupo hidroxilo del C4 de la porción ribitilo del FAD (sección 1.2.6.1). Las estructuras cristalográficas de FNR de espinaca en complejo con 2'-P-AMP (41, 59) y de FNR de *Anabaena* en complejo con NADP^+ (60) indican que la interacción de K110 con el sustrato se daría a través de un puente de hidrógeno entre el amino de la cadena lateral y el 5'-fosfato del NADP^+ (sección 1.2.7.1). En la sección 5.2.2 de esta Tesis se demuestra que en el complejo productivo entre FNR y NADP^+ la interacción se establecería con el grupo fosfato de la porción NMN del sustrato (**Figura 5.3**). Sin embargo, ya sea la interacción con uno u otro de los fosfatos del puente pirofosfato del sustrato, es aceptado que el residuo K110 juega un papel clave en la unión y en la orientación adecuada del NADP^+ en FNR (98). En la **Figura 4.8** se representan las interacciones del residuo homólogo a K110 con el grupo prostético y con el análogo del sustrato 2'-P-AMP. Se postula entonces al residuo K110 como un transductor entre el reposicionamiento de la isoaloxazina del grupo prostético y la disminución de afinidad por la porción 2'-P-ADP del sustrato.

En la **Figura 4.9** se esquematiza el cambio conformacional en la mutante FNR Y89F que explicaría la disminución de $K_d^{\text{NADP}^+}$ y el aumento del porcentaje de ocupación del sitio activo por la nicotinamida. El mismo modelo sería aplicable para interpretar los resultados obtenidos con la mutante FNR Y89W. Los cambios conformacionales propuestos pueden idealizarse del siguiente modo: 1) la ausencia del grupo hidroxilo en el residuo en posición 89, producto de la sustitución de la tirosina por fenilalanina o triptofano, debilita la interacción que mantiene correctamente posicionada a la isoaloxazina, 2) la reubicación de la isoaloxazina altera las

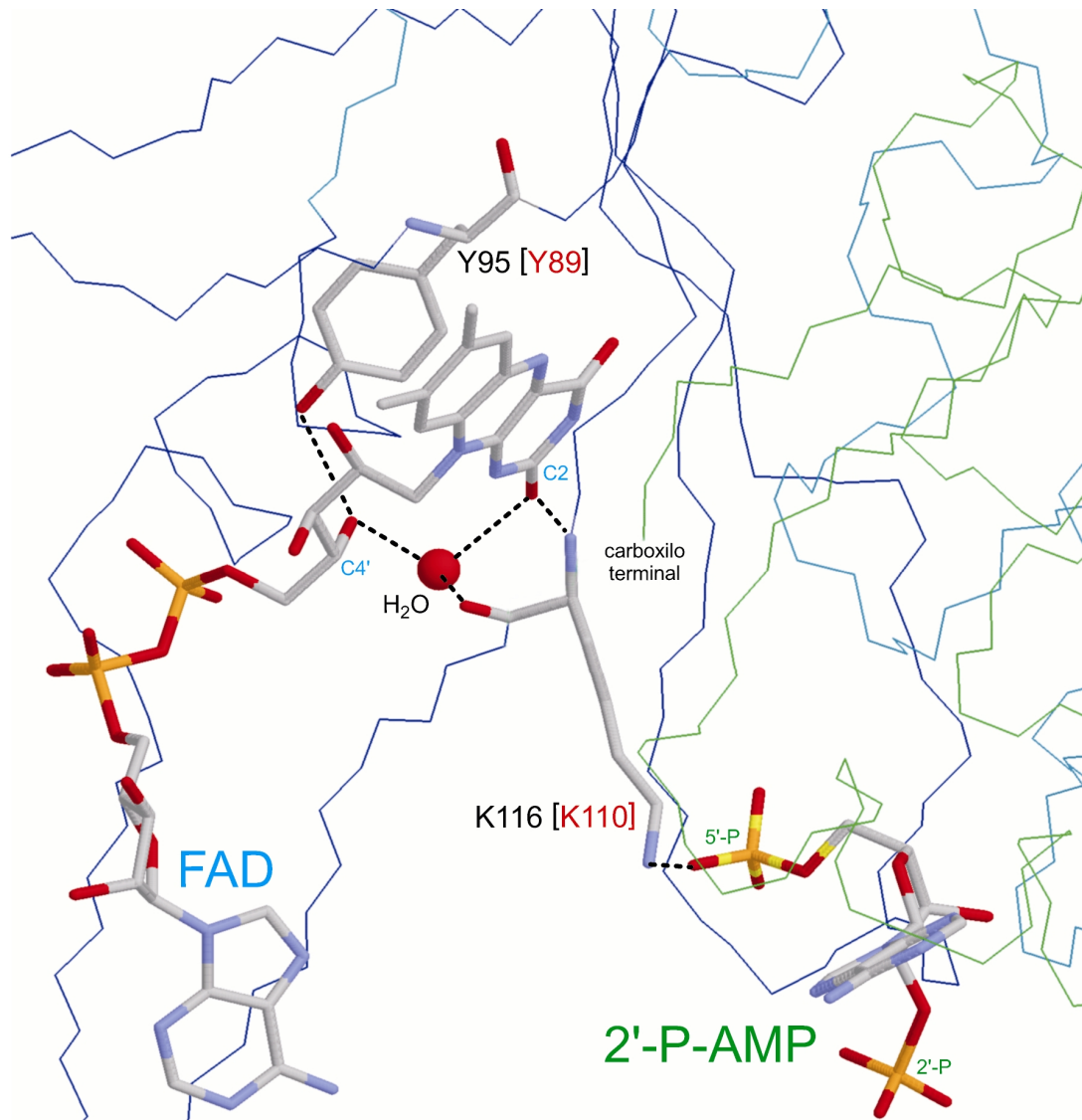


Figura 4.8 Interacciones del residuo lisina 116 y tirosina 95 en la FNR de *Spinacia oleracea*. Las coordenadas cristalográficas corresponden a la estructura de FNR oxidada de *Spinacia oleracea* en complejo con 2'-P-AMP (Identificador PDB: 1FND, **Tabla 1.2**, 59). Los residuos homólogos a Y95 y K116 en FNR de *Pisum sativum* se indican entre corchetes. Las interacciones del tipo puente de hidrógeno se representaron con líneas punteadas.

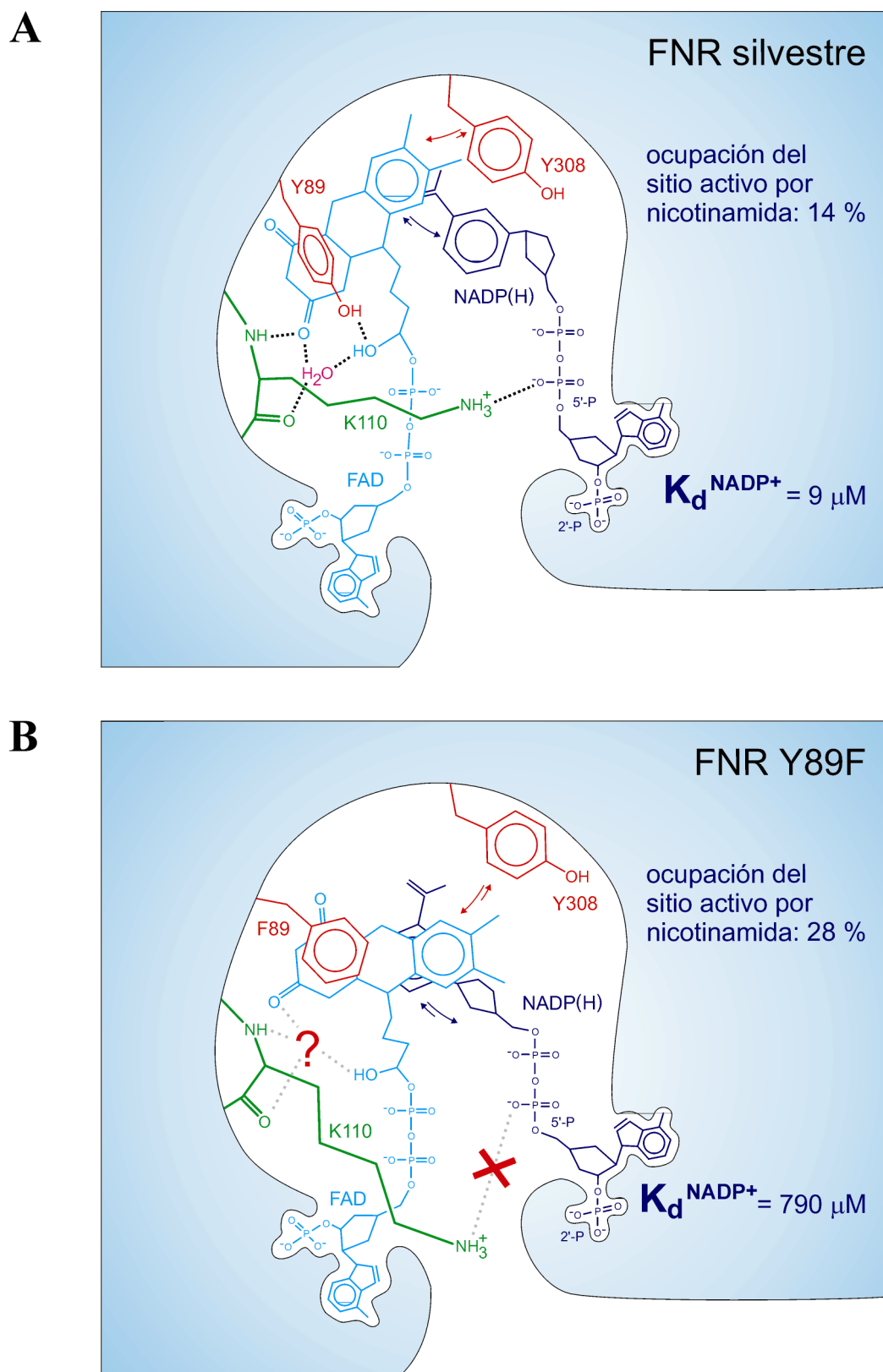


Figura 4.9 Modelo comparativo de las interacciones relevantes en los complejos FNR silvestre/NADP(H) y FNR Y89F/NADP(H). Las líneas punteadas representan puentes de hidrógeno y las flechas simbolizan la ocupación del sitio activo por la cadena lateral de Y308 o el anillo de nicotinamida del NADP^+ . La cruz roja sobre la línea punteada indica la ausencia de interacción puente de hidrógeno. **A**, FNR silvestre. **B**, FNR Y89F.

interacciones del FAD con la cadena peptídica del residuo K110, y dificulta el apilamiento de la cadena lateral de Y308 contra su cara *re*, permitiendo una mayor ocupación por la nicotinamida, 3) el cambio en la red de puentes de hidrógeno entre el FAD y la cadena peptídica de K110 provoca un desplazamiento de la cadena lateral del residuo K110 que impide la formación del puente de hidrógeno con el pirofosfato del sustrato, 4) la ausencia de este puente de hidrógeno disminuye la afinidad por la parte 2'-P-ADP del sustrato, con el consiguiente incremento en la $K_d^{NADP^+}$.

El estudio de una mutante de FNR de *Anabaena* en R100, el residuo homólogo a K110 de arveja, soporta ampliamente el último punto del modelo sugerido. La mutante FNR R100A se ideó con el fin de estudiar el papel de la interacción puente de hidrógeno entre la cadena lateral de R100 y el 5'-fosfato del sustrato (98). El análisis de la formación del complejo FNR R100A/NADP⁺ permitió concluir que la sustitución de la arginina silvestre por alanina impediría la formación del puente de hidrógeno mencionado. La $K_d^{NADP^+}$ de FNR R100A resultó 423 μ M contra una $K_d^{NADP^+}$ de 5,7 μ M para FNR silvestre de *Anabaena*. Es decir, en FNR R100A de *Anabaena* se detectó un aumento de la $K_d^{NADP^+}$ de 74 veces, de manera comparable a los aumentos de 85 y 51 veces determinados para las mutantes FNR Y89F y FNR Y89W respectivamente. Por lo tanto, si bien el modelo propuesto es relativamente especulativo, sólo se carece de evidencias para su tercer punto, es decir la relación entre la reubicación de la isoaloxazina y la ruptura del puente de hidrógeno entre K110 y el pirofosfato del NADP⁺.

Los estudios de cinética enzimática realizados con FNR Y89F y FNR Y89W se centraron en la reacción diaforasa (**Ecuación 1.2**), por lo tanto no es posible discutir el comportamiento de las mutantes en la reacción Fd-NADP⁺ reductasa (**Ecuación 1.1**). El análisis de la cinética en estado estacionario de la reacción NADPH-

$K_3Fe(CN)_6$ diaforasa permitió estimar los parámetros k_{cat} y K_m^{NADPH} de FNR Y89F y FNR Y89W (**Figura 4.6**). En la **Figura 4.7** pueden compararse los valores determinados para las mutantes con los de la enzima silvestre. La K_m^{NADPH} de FNR Y89F resultó aproximadamente el doble que la de FNR silvestre, mientras que la K_m^{NADPH} de FNR Y89W no mostró ninguna modificación dentro de los márgenes de error de las medidas. Aunque no fueron determinadas, es razonable suponer que las K_d^{NADPH} son de una magnitud comparable a las K_m^{NADPH} de las mutantes. Esta aproximación es válida ya que en el mecanismo de reducción de FNR por NADPH, el paso que sigue a la formación del complejo $FNR_{oxidada}/NADPH$, es decir la transferencia de electrones para formar $FNR_{reducida}/NADP^+$, es un paso limitante de la velocidad global (168). Por lo tanto, aceptando que las K_d^{NADPH} no hubieran sufrido una gran alteración por la sustitución del residuo Y89, resulta necesario explicar la aparente discrepancia entre las bajísimas afinidades de las mutantes por $NADP^+$ y las afinidades supuestamente conservadas por NADPH. Es importante recalcar que la unión de la molécula de $NADP^+$ es gobernada por la parte 2'-P-AMP, una porción del dinucleótido que no se altera durante la reducción a NADPH (91). El mantenimiento de la afinidad por NADPH podría explicarse en el marco del modelo propuesto para la interacción del $NADP^+$ con las mutantes, postulando que la unión de la nicotinamida reducida favorecería el reacomodamiento de la isoaloxazina en una posición tal que mantiene el puente de hidrógeno entre K110 y el 5'-fosfato del sustrato.

La mutante FNR Y89F exhibió una reducción moderada de la k_{cat} (**Figura 4.7**), probablemente debida a que el posicionamiento de la isoaloxazina no resultó óptimo para la transferencia de hidruro. El descenso de la k_{cat} y el aumento de la K_m^{NADPH} llevaron la k_{esp}^{NADPH} de la mutante FNR Y89F a un 17 % del valor obtenido para FNR silvestre. Para la mutante FNR Y89W se determinó una k_{cat} que sólo alcanzó

el 0,4 % del valor estimado para la enzima silvestre. Como no hubo modificación del K_m^{NADPH} , la k_{esp}^{NADPH} mostró el mismo descenso que la k_{cat} . Aunque muy notoria, no debería atribuirse gran significación a la ausencia de cambios en la K_m^{NADPH} de FNR Y89W respecto a la K_m^{NADPH} de la enzima silvestre. Los parámetros fundamentales de la ecuación de Michaelis-Menten son la constante catalítica (k_{cat}) y la constante de especificidad (k_{esp}^{NADPH}), aunque por razones históricas es más usual expresarla en términos de k_{cat} y de K_m (168). Muchos aspectos del comportamiento de las enzimas pueden ser comprendidos más fácilmente como un efecto de la k_{cat} sobre la k_{esp} o viceversa, en consecuencia es preferible interpretar el K_m como el cociente de los dos parámetros fundamentales (168). De este modo, la estrecha semejanza entre ambos valores de K_m^{NADPH} sería el fruto de reducciones independientes en la k_{cat} y en la k_{esp}^{NADPH} que fortuitamente tuvieron casi la misma magnitud. Esta disminución tan marcada de la actividad en FNR Y89W no estaría relacionada con una incapacidad de posicionar la nicotinamida enfrentada a la isoaloxazina, ya que el porcentaje de ocupación del sitio activo por nicotinamida a concentraciones saturantes de $NADP^+$ resultó aún mayor que el de la enzima silvestre (**Figura 4.7**). Sin embargo, esta unión podría ser no productiva, es decir con una geometría de la nicotinamida respecto a la isoaloxazina que dificulte la transferencia de hidruro entre el átomo C4 del NADPH y el átomo N5 de la flavina. En este sentido, las diferencias observadas en la región de 420-460 nm del espectro diferencial de formación del complejo FNR Y89W/ $NADP^+$ (**Figura 4.5**) podrían estar reflejando esta particularidad en el modo de unión del sustrato.

Los experimentos presentados en este capítulo justifican la absoluta conservación del residuo homólogo a la tirosina 89 en todas las secuencias conocidas de FNR. Se demostró que la aromaticidad de la cadena lateral de la tirosina 89 es

importante para la fijación del grupo prostético, aunque el grupo hidroxilo también contribuye en alguna medida. El puente de hidrógeno entre la tirosina 89 y el ribitilo del FAD resultaría indispensable para definir una conformación adecuada para la interacción entre la lisina 110 y el NADP^+ , ya que la sustitución de la tirosina 89 por fenilalanina disminuyó dramáticamente la afinidad por este sustrato. Finalmente, la sustitución por triptofano prácticamente anuló la capacidad catalítica de la enzima, indicando que no es suficiente la aromaticidad del residuo para mantener una geometría compatible con la transferencia de hidruro.

5 PARTICIPACIÓN DEL RESIDUO Y308 EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE FERREDOXINA-NADP⁺ REDUCTASA DE ARVEJA

5.1 Introducción

Hasta el presente, la geometría de la unión productiva entre piridín nucleótidos y flavoenzimas sólo había sido determinada en miembros de dos familias estructurales diferentes. El modo de unión del NAD(P)(H) en una de estas familias fue conocido gracias a la resolución de las estructuras de la glutatión reductasa humana de eritrocitos (99, 100) y de la NADH peroxidasa de *Enterococcus faecalis* (101) en complejos con sus respectivos sustratos. Posteriormente, la obtención de la estructura de la quinona reductasa de hígado de rata en complejo con NADP⁺ (102) permitió dilucidar la geometría de la unión del sustrato piridín nucleótido en la otra familia estructural. En las primeras dos estructuras mencionadas, el anillo de nicotinamida se enfrenta en forma coplanar al anillo central de la isoaloxazina (anillo B), ubicándose el átomo C4 del piridín nucleótido adyacente al átomo N5 del FAD. En la estructura del complejo entre NADP⁺ y la quinona reductasa, la nicotinamida también se ubica coplanar a la isoaloxazina, aunque no se encuentra enfrentada al anillo B de la flavina. Estos precedentes sirven de marco estructural para sostener las líneas actuales de pensamiento respecto a los mecanismos de transferencia de hidruro entre flavina y nicotinamida.

En los estudios efectuados con FNR de espinaca (41, 59) o de *Anabaena* PCC 7119 (60), sólo se ha obtenido información acerca de la interacción con la porción 2'-P-AMP del NADP⁺ (sección 1.2.7.1), ya que la porción nicotinamida no resultó visible (41, 59) o se ubicó demasiado alejada de la flavina para ser funcionalmente relevante (60). A pesar de diferentes experimentos cristalográficos y de numerosos ensayos realizados con distintas enzimas, la geometría de la unión entre FNR y la

porción activa del sustrato piridín nucleótido no ha podido ser establecida. Asimismo, tampoco se han obtenido estructuras de otros miembros de la superfamilia FNR en complejo productivo con el dinucleótido sustrato.

En las estructuras de FNR y de otras flavoenzimas estrechamente relacionadas, la cadena lateral de un residuo aromático se ubica en forma paralela y cercana a la cara *re* de la flavina (41, 59, 60, 66, 71, 78). En las FNRs tipo plastídicas, este aminoácido corresponde a una tirosina absolutamente conservada, posicionada en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Basándose en analogías con los complejos conocidos de flavoenzimas con piridín nucleótidos (99, 100-102), en el modo de unión del análogo 2'-P-AMP (41, 59), y en la estereoespecificidad de la transferencia de hidruro (104), se ha propuesto que en el complejo enzima-sustrato la nicotinamida del NADP^+ ocuparía el mismo espacio que corresponde a la cadena lateral de la tirosina carboxilo terminal (Y308 en FNR de arveja, Y314 en FNR de espinaca y Y303 en FNR de *Anabaena*). Según esta hipótesis la unión de NADP^+ debería involucrar un rearrreglo estructural en el que la cadena lateral de la tirosina carboxilo terminal se desplazaría, tomando su lugar el anillo de nicotinamida (sección 1.2.7.2). Probablemente el costo energético que supone el desplazamiento de la tirosina terminal de su bolsillo de unión frente a la isoaloxazina sería similar a la ganancia energética debida a la unión de la nicotinamida. Así, se generaría un estado desordenado de la tirosina y de la nicotinamida que impediría la determinación de sus posiciones en el complejo enzima-sustrato.

Asumiendo la validez de esta interpretación, la sustitución de la tirosina carboxilo terminal por un residuo cuya cadena lateral no fuese aromática estabilizaría el complejo FNR/ NADP^+ , ya que se favorecería la termodinámica de la unión de la porción nicotinamida del sustrato a la enzima. Esta hipótesis se verificó mediante el

análisis espectroscópico y cristalográfico de mutantes de FNR de arveja en las que el residuo tirosina en posición 308 fue sustituido por triptofano o por serina. Estas mutantes habían sido generadas previamente para estudiar el papel desempeñado por la tirosina carboxilo terminal en la estructura y función de la enzima (127, 157).

Como la gran mayoría de las óxido-reductasas involucradas en vías anabólicas reductivas, FNR muestra una preferencia por NADP(H) miles de veces mayor que la que ostenta por NAD(H). Más aún, la afinidad de FNR por NAD(H) es tan reducida que las técnicas basadas en espectroscopía diferencial empleadas usualmente para analizar las interacciones entre FNR y sus sustratos no permiten la determinación de la constante de disociación del complejo (105). Sin embargo, el incremento en la afinidad por la nicotinamida que se esperaba obtener en las mutantes con un residuo carboxilo terminal no aromático, también podría favorecer la unión de NAD(H). Es decir, si la remoción de la cadena lateral aromática facilitase la unión de la nicotinamida, y en consecuencia provocase un incremento en la afinidad global por NADP(H), también resultaría razonable suponer un aumento en la afinidad por NAD(H), ya que la porción nicotinamida es común a ambos dinucleótidos. Por lo tanto, se estudió para cada FNR mutante el grado de interacción con NADP^+ o con NAD^+ , así como la capacidad de las enzimas para emplear las formas reducidas de estos piridín nucleótidos como sustratos.

En la tercera etapa de este trabajo de Tesis se revela el modo de unión productivo de la nicotinamida en el sitio activo de FNR, soportado por las estructuras cristalográficas de los complejos FNR Y308W/ NADP^+ , FNR Y308S/ NADP^+ y FNR Y308S/ NADP(H) . Asimismo, se demuestra el papel del residuo Y308 en la modulación de la afinidad y la especificidad de FNR por piridín nucleótidos.

5.2 Resultados

5.2.1 Espectros de absorción electrónica de mutantes de ferredoxina-NADP⁺ reductasa en el residuo Y308

La caracterización de las mutantes de FNR en el residuo Y308 se inició con la determinación de los espectros de absorción electrónica de las flavoproteínas puras. En primer lugar se efectuaron preparaciones de las proteínas de fusión GST-FNR silvestre, GST-FNR Y308W y GST-FNR Y308S (sección 2.2.6). Luego se escindieron las fusiones con proteasa Xa y se purificaron a homogeneidad las distintas variantes de FNR libres de GST (sección 2.2.7).

En la **Figura 5.1** se muestran los espectros de absorción electrónica de las mutantes comparados con el de la enzima silvestre. Los coeficientes de extinción se obtuvieron por cuantificación espectrofotométrica del FAD extraído de la holoproteína (sección 2.3.5). Como se observa en el recuadro de la **Figura 5.1**, las mutantes mostraron incrementos en el coeficiente de extinción de $1,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en la región de 385 nm, y una disminución de $1,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ del coeficiente de extinción a 471 nm para la mutante FNR Y308S. Sin embargo la característica más sobresaliente fue el gran corrimiento hacia el rojo que exhibió el espectro de la mutante FNR Y308S, una perturbación espectral similar a la que se observa luego de la formación del complejo entre FNR y NADP⁺ (sección 4.2.4). Las características del espectro, y el aumento en la afinidad por NADP⁺ que se esperaba luego de la sustitución de la tirosina 308 por un residuo con cadena lateral no aromática, sugerían que el protocolo básico seguido para la preparación de las mutantes (sección 2.2.6 y 2.2.7) llevó a la purificación de FNR Y308S como un complejo con NADP⁺. Confirmando esta hipótesis, el ligando unido pudo ser desplazado de FNR Y308S por filtración en gel en presencia del inhibidor

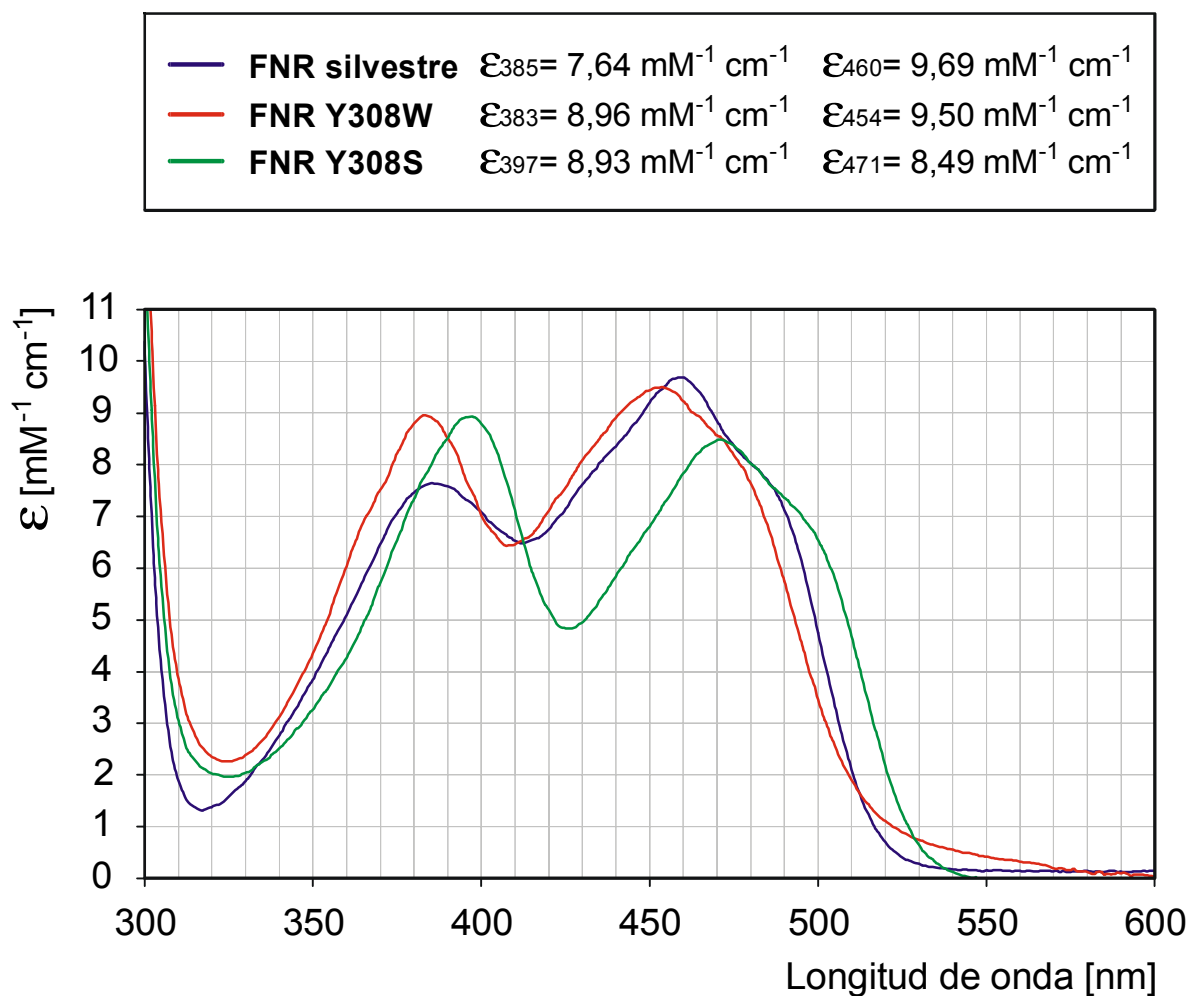


Figura 5.1 Espectros de absorción electrónica de FNR silvestre y de mutantes de FNR en el residuo Y308. Los espectros se determinaron a 20°C en celdas de 1 cm de paso conteniendo la flavoproteína a una concentración de 50 a 70 μM en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0. Los coeficientes de extinción se determinaron como se describe en la sección 2.3.5 de Materiales y Métodos.

competitivo 2'-P-AMP (sección 2.2.8). El incremento de absorbancia a 340 nm luego de la adición de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato al eluato, permitió identificar al ligando como NADP^+ . Luego de la eliminación del NADP^+ unido (sección 2.2.8), el espectro de Y308S resultó similar al de la enzima silvestre, regenerándose el espectro original por adición de NADP^+ . Estos resultados junto a los presentados en las secciones 5.2.2 y 5.2.3 implican que FNR Y308S incorporó NADP^+ en el citosol de *E. coli* y lo unió tan fuertemente que la mutante se mantuvo como un complejo con el sustrato a través de todos los pasos del protocolo básico de purificación.

5.2.2 Estructuras cristalográficas de ferredoxina- NADP^+ reductasa de arveja

5.2.2.1 Estructura de ferredoxina- NADP^+ reductasa silvestre

En el marco de un proyecto de investigación conjunto, cuyo objetivo fue la determinación de la geometría de la unión productiva entre NADP^+ y FNR, las preparaciones de FNR silvestre, FNR Y308W y FNR Y308S sin el tratamiento para la liberación del NADP^+ unido, fueron enviadas al laboratorio del Dr. P.A. Karplus de la Universidad de Cornell, Ithaca, USA. Como resultado de esta colaboración se resolvieron las estructuras cristalográficas de FNR silvestre de arveja a 2,5 Å y de los complejos FNR Y308S/ NADP^+ , FNR Y308W/ NADP^+ y FNR Y308S/ NADPH a 1,8 Å, 2,0 Å y 1,7 Å respectivamente (147).

La estructura cristalina de FNR silvestre de arveja, incluyendo a dos monómeros en la unidad asimétrica, permitió comprobar que el alto grado de homología exhibido por las estructuras primarias de FNR de arveja y FNR de espinaca se extiende también a sus estructuras terciarias. Una de las formas de expresar las desviaciones entre dos estructuras similares es el índice RMSD, que se calcula como la raíz cuadrada de la distancia cuadrática media entre los átomos homólogos de cada estructura. La semejanza entre FNR de arveja y FNR de espinaca se vio reflejada en el bajo índice

RMSD computado para los átomos del esqueleto peptídico de ambas proteínas, el cual asumió un valor de 0,52 Å. En las dos estructuras de FNR superpuestas de modo de minimizar el RMSD de sus esqueletos peptídicos, las posiciones de las cadenas laterales de los residuos aromáticos estudiados en este trabajo de Tesis mostraron una gran conservación, con un RMSD = 0,372 Å para Y89/Y95 (numeración del residuo en FNR de arveja/FNR de espinaca) y un RMSD = 0,311 Å para Y308/Y314. Además, la posición y la orientación de las cadenas laterales de estos residuos también se encontró conservada respecto a la flavina, formando ángulos de 54°/57° (Y89/Y95) y 5°/1° (Y308/Y314) con el plano de la isoaloxazina. Cada parámetro informado representa el valor medio de los parámetros calculados con cada uno de los dos monómeros de FNR de arveja en la unidad asimétrica, parámetros que en ningún caso difirieron entre sí más que un 4 %. Dado el alto grado de similitud entre las estructuras de FNR de arveja y FNR de espinaca, sólo se hará hincapié en la nueva información que se refiere a la unión de la parte nicotinamida del NADP⁺ y a la geometría del sitio activo de la enzima.

5.2.2.2 Estructura del complejo FNR Y308S/NADP⁺

La mutante FNR Y308S sin la aplicación previa del tratamiento para la liberación del NADP⁺ unido fue cristalizada, ya sea con agregado de NADP⁺ o sin él, obteniéndose cristales isomorfos cuya estructura fue resuelta por reemplazo molecular. En total acuerdo con la perturbación observada en los análisis espectroscópicos de las flavoproteínas en solución (**Figura 5.1**), los cristales de FNR Y308S mostraron un inusual color naranja-amarillento en vez del amarillo brillante característico de FNR. Los mapas de densidad electrónica para ambos cristales evidenciaron claramente una fuerte densidad correspondiente a una molécula completa de NADP⁺, confirmando la naturaleza del ligando que copurificó unido a la proteína, y probando de una forma

directa que la porción nicotinamida se unió en esta mutante con un nivel de ocupación de aproximadamente el 100%.

La estructura cristalina del complejo FNR Y308S/NADP⁺ se refinó a una resolución de 1,8 Å e incluyó en la unidad asimétrica a dos moléculas que fueron altamente similares tanto en la geometría de unión del NADP⁺, como en la conformación del sitio activo. La estructura global de este complejo es equivalente a la de FNR silvestre de hojas de espinaca (41, 59) y FNR de *Anabaena* (60), sin cambios significativos en las orientaciones relativas de los dominios para la unión de FAD o de NADP⁺. El grupo 2'-fosforilo del NADP⁺ interactúa con las cadenas laterales de S228, R229, K238 y Y240. En general la porción 2'-P-AMP del NADP⁺ se une como ya se ha descrito para FNR de espinaca (**sección 1.2.7.1**, 41, 59).

En la **Figura 5.2.A** se observan dos vistas ilustrando la geometría de la interacción entre el NADP⁺ y el FAD en el complejo FNR Y308S/NADP⁺. En la **Figura 5.3** se muestra un detalle de las interacciones principales que estabilizarían este complejo. El fosfato nicotinamida recibe un puente de hidrógeno del átomo Nζ de K110 en el dominio de unión de FAD (**Figura 5.3**) y otro proveniente del átomo N de T166 en el bucle rico en glicinas. Esta última interacción no se muestra en las figuras dado que dificulta la observación de las otras interacciones. Como se menciona en la **sección 4.3**, la interacción del residuo K110 (o los residuos homólogos en FNRs de otros orígenes) con el puente pirofosfato del NADP⁺ fue anticipada gracias a estudios de modificación química y mutagénesis dirigida (95, 122). La corroboración directa de esta interacción apoya al modelo discutido en la **sección 4.3** de esta Tesis, que explica la disminución de afinidad por NADP⁺ en las mutantes FNR Y89F y FNR Y89W (**Figura 4.9**).

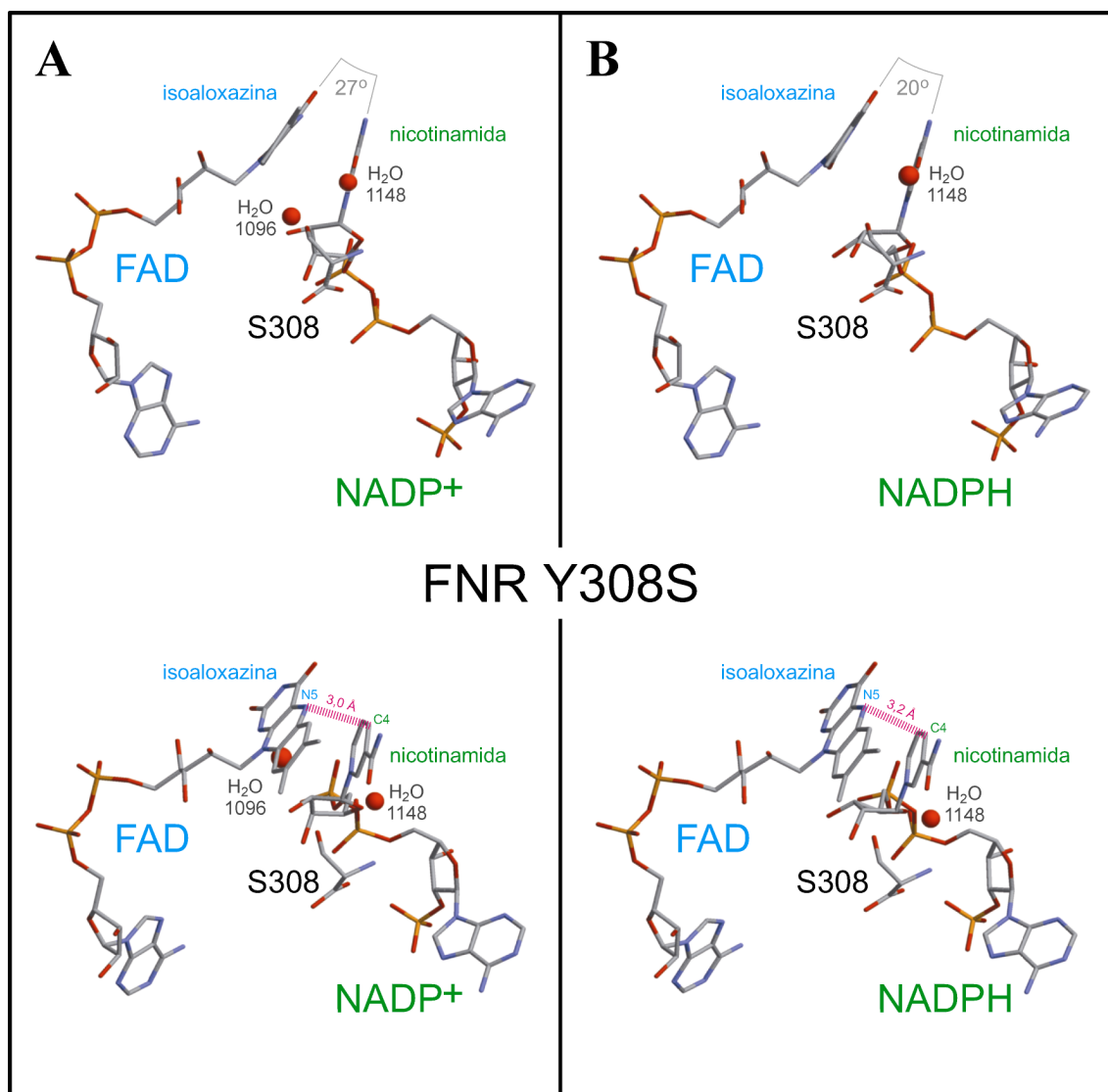


Figura 5.2 Geometría de la unión de la porción nicotinamida del NADP(H) en el complejo FNR Y308S/NADP(H). Se muestran dos vistas del grupo prostético FAD, el residuo S308, el NADP(H) y las moléculas de agua 1096 y 1148 ubicadas en el sitio activo de la enzima, de acuerdo a las coordenadas cristalográficas de los monómeros A de los correspondientes complejos en las unidades asimétricas. Se indica en gris el ángulo formado entre la nicotinamida y la isoaloxazina (primera vista), y en magenta la interacción entre el átomo C4 de la nicotinamida y el átomo N5 de la isoaloxazina (segunda vista). **A**, Complejo FNR Y308S/NADP⁺ (Identificador PDB: 1QFY). **B**, Complejo FNR Y308S/NADPH (Identificador PDB: 1QFZ). En este complejo se encuentra ausente la molécula de agua 1096.

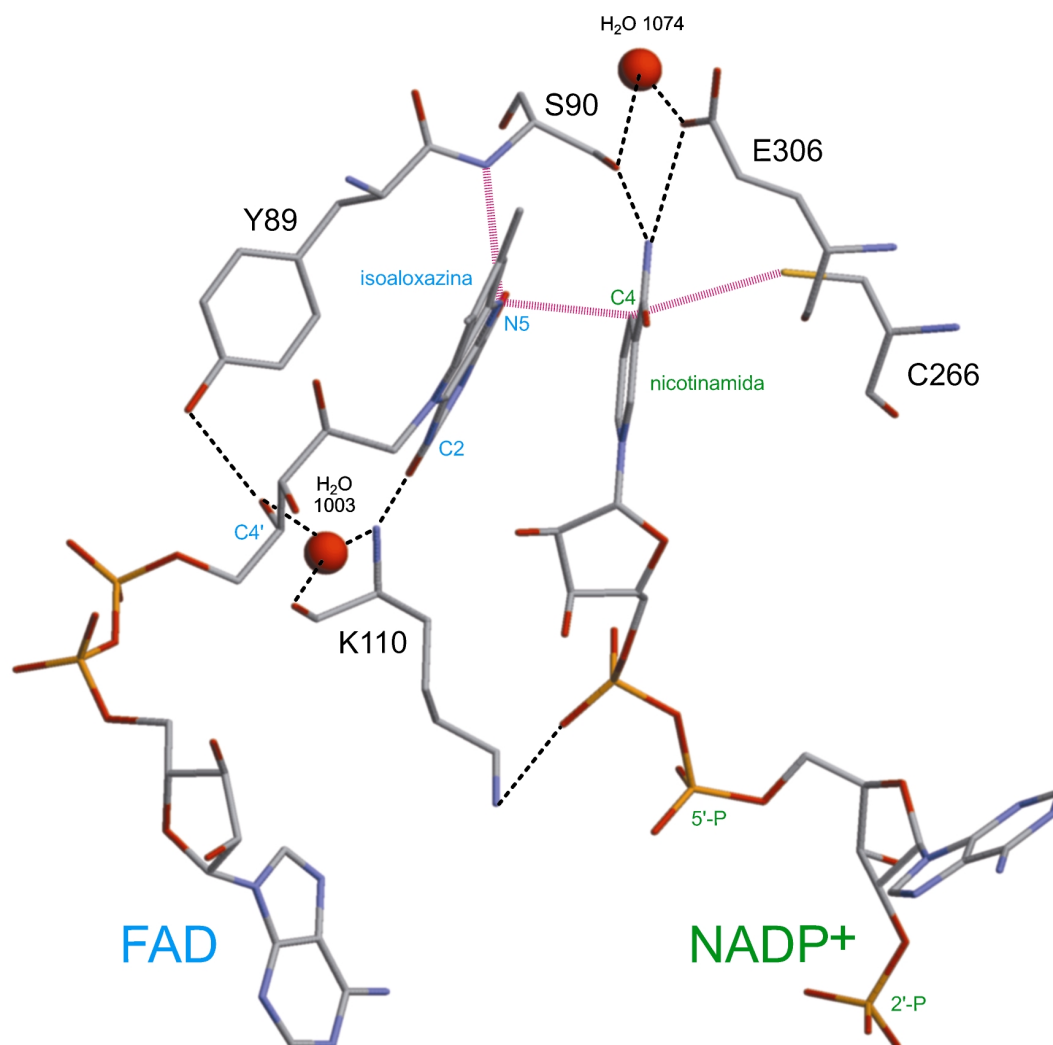


Figura 5.3 Detalle de las interacciones relevantes en el complejo productivo entre NADP⁺ y FNR de *Pisum sativum*. El esquema está basado en las coordenadas cristalográficas del monómero A del complejo FNR Y308S/NADP⁺ en la unidad asimétrica (Identificador PDB: 1QFY). Para mejorar la inteligibilidad del mismo, no se muestran las moléculas de agua 1096 y 1148, ni el residuo S308, ya representados en la Figura 5.2. Las líneas punteadas representan puentes de hidrógeno y las líneas en color magenta indican interacciones de van der Waals.

La nicotinamida del NADP^+ enfrenta su cara A a la cara *re* del anillo B de la isoaloxazina (**Figura 5.2.A**, **Figura 5.3**), en una disposición coherente con la estereoquímica de la transferencia de hidruro informada para esta enzima (104). El átomo C4 de la nicotinamida y el átomo N5 del FAD distan 3,0 Å, en un arreglo que resulta razonable para una transferencia directa de hidruro. En contraste con la disposición observada en glutatión reductasa, NADH peroxidasa y quinona reductasa (**sección 5.1**), la nicotinamida y la isoaloxazina no se encuentran completamente coplanares, sino que forman un ángulo de aproximadamente 27° (**Figura 5.2.A**). El átomo C4 de la nicotinamida es el más cercano a la isoaloxazina y el átomo N1 de la nicotinamida es el más lejano (aproximadamente a 5 Å del átomo C10 del FAD). La estructura del complejo FNR Y308S/ NADP^+ también revela que la cadenas laterales de S90 y E306 forman puentes de hidrógeno con el átomo de nitrógeno del grupo carboxiamida de la nicotinamida y que el grupo sulfidrilo del residuo conservado C266 hace un contacto de van der Waals con la cara B de la nicotinamida en el átomo C4 (**Figura 5.3**). Finalmente, el residuo S308 que sustituye al residuo tirosina de la proteína silvestre, forma un puente de hidrógeno entre su átomo O γ y el hidroxilo 2' de la ribosa más próxima a la nicotinamida (interacción no representada en las figuras).

5.2.2.3 Estructura del complejo FNR Y308S/NADPH

La estructura del complejo FNR Y308S/NADPH a una resolución de 1,7 Å resultó casi idéntica a la de FNR Y308S/ NADP^+ (**Figura 5.2.B**). Como puede observarse comparando las **Figuras 5.2.A** y **5.2.B**, las únicas diferencias importantes fueron la desaparición de un sitio de solvente (H_2O 1096) y un cambio en la ribosa más próxima a la nicotinamida. Existen otras diferencias más sutiles en el sitio activo, como una inclinación de la isoaloxazina que lleva a un ángulo nicotinamida-isoaloxazina de aproximadamente 20° y a un incremento en la distancia entre el átomo C4 del NADPH

y el átomo N5 del FAD de 3,0 Å a 3,2 Å. El desplazamiento de la flavina implica el movimiento correlacionado de muchos átomos, cambios que se revelan casi idénticos en ambos monómeros refinados independientemente. Estas evidencias indican que las variaciones observadas son genuinas. Los desplazamientos observados podrían deberse al hidrógeno adicional sobre el átomo C4 de la nicotinamida (o sobre el átomo N5 de la flavina), y cabe interpretarlos según la siguiente secuencia idealizada de eventos. A causa del hidrógeno adicional, el borde de la isoaloxazina que contiene el átomo N5 se inclinaría alejándose de la nicotinamida, e involucrando un desplazamiento de los átomos O2 y O4 de la flavina de aproximadamente 0,4 Å. Este movimiento llevaría a un impedimento estérico entre el átomo O2 y la molécula H₂O 1096. Esta molécula de agua se expelería de su sitio de unión y finalmente la ausencia de la misma dejaría espacio entre la ribosa próxima a la nicotinamida y el FAD, permitiendo a la ribosa relajarse hacia la flavina.

5.2.2.4 Estructura del complejo FNR Y308W/NADP⁺

La estructura a una resolución de 2 Å de FNR Y308W cocrystalizada con NADP⁺ reforzó el argumento según el cuál el modo de unión del piridín nucleótido en la estructura del complejo FNR Y308S/NADP⁺ reflejaría la geometría de la unión productiva del mismo en FNR silvestre. Debido a la conservación del carácter aromático de la cadena lateral de su residuo carboxilo terminal, se suponía que la unión de la porción nicotinamida a FNR Y308W iba a resultar menos favorecida que la unión a FNR Y308S, aunque con una geometría más cercana a la postulada para FNR silvestre. En la estructura de Y308W la densidad electrónica mostró claramente una mezcla de dos conformaciones en el sitio para la unión de nicotinamida. En una de las conformaciones la cadena lateral del triptofano se ubicó en forma coplanar con la isoaloxazina (**Figura 5.4.A**), una disposición homóloga a la de la cadena lateral de

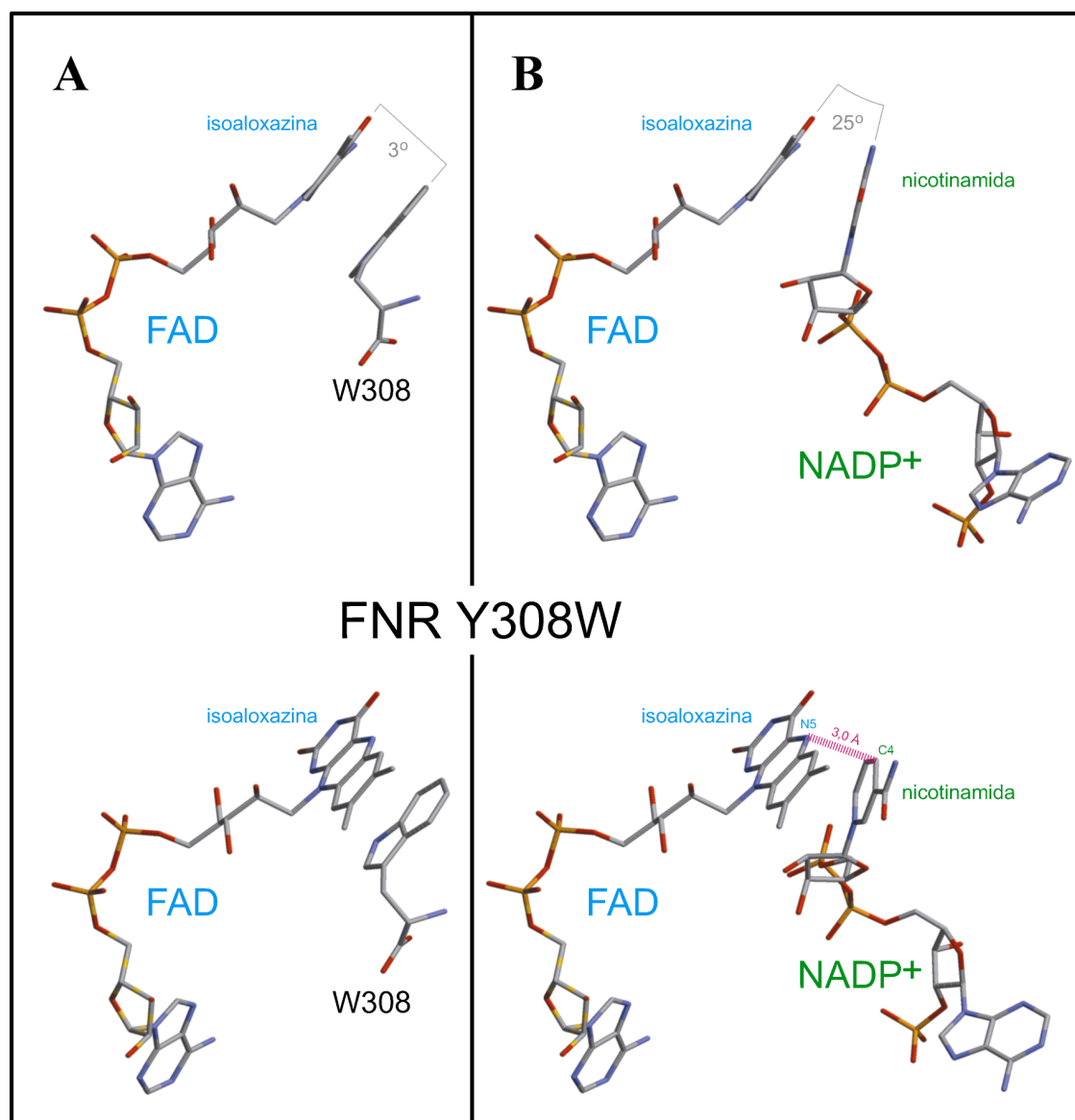


Figura 5.4 Geometría de la interacción entre la cadena lateral de W308 y la isoaloxazina y de la unión de la porción nicotinamida del NADP⁺ en el complejo FNR Y308W/NADP⁺. En la estructura del complejo FNR Y308W/NADP⁺ la densidad electrónica mostró una mezcla de dos conformaciones: una con la cadena lateral de W308 coplanar al anillo de isoaloxazina y otra con la nicotinamida del NADP⁺ unida como en el complejo FNR Y308S/NADP⁺. Se muestran dos vistas del grupo prostético FAD y el residuo W308 o el sustrato NADP⁺, de acuerdo a las coordenadas cristalográficas del monómero A del complejo FNR Y308S/NADP⁺ en la unidad asimétrica (Identificador PDB: 1QGA). Se indica en gris el ángulo formado entre la isoaloxazina y la cadena lateral de W308 o la nicotinamida del NADP⁺ (primera vista). **A**, Interacción entre la cadena lateral de W308 y la isoaloxazina. **B**, Interacción entre la nicotinamida y la isoaloxazina. Se indica en magenta la interacción entre el átomo C4 de la nicotinamida y el átomo N5 de la isoaloxazina (segunda vista).

Y308 en FNR silvestre (**Figura 1.10**). En la otra conformación el anillo de nicotinamida del NADP^+ se enfrentó con la cara *re* de la isoaloxazina formando un ángulo de aproximadamente 25° , con el átomo C4 de la nicotinamida y el átomo N5 del FAD a una distancia de 3,0 Å (**Figura 5.4.B**). Esta disposición resultó casi idéntica a la determinada en el complejo FNR Y308S/ NADP^+ (**Figura 5.2.A**). La contribución de cada conformación resultó compatible con una ocupación del sitio activo por nicotinamida del 40 %.

La distancia promedio entre el anillo de indol de W308 y los anillos de la isoaloxazina es de aproximadamente 3,3 Å. No se observó otra densidad electrónica atribuible a una posición de la cadena lateral de W308 fuera del sitio activo, sugiriendo que cuando ésta es desplazada no adopta una posición bien ordenada. La ausencia de una posición bien ordenada de la cadena lateral de W308 fuera del sitio activo y la similitud entre las conformaciones de la nicotinamida en los complejos FNR Y308S/ NADP^+ y FNR Y308W/ NADP^+ constituyen evidencias de que el residuo en posición 308 de FNR silvestre tiene poca influencia en la geometría de la nicotinamida unida al sitio activo de la enzima.

5.2.3 Interacción de mutantes de ferredoxina- NADP^+ reductasa en el residuo Y308 con piridín nucleótidos

Como se explicó en la sección 4.2.4, la titulación de FNR con NADP^+ lleva a cambios espectrales que dependen de la forma en que el piridín nucleótido interacciona con la enzima. En particular, la intensidad del pico diferencial positivo en la región de 515 nm se correlaciona con el grado de ocupación de la cara *re* de la flavina por la nicotinamida (94, 122, 128, 129). Por lo tanto, las titulaciones de FNR con NAD(P)^+ permiten tanto el cálculo de la constante de disociación del complejo entre la

enzima y el piridín nucleótido, como la estimación del porcentaje de ocupación del sitio activo por la porción nicotinamida del mismo.

En la **Figura 5.5** pueden apreciarse los espectros diferenciales de absorción electrónica debidos a la unión de NADP^+ a las diferentes variantes de FNR. La gran intensidad del pico que mostró el espectro diferencial de *FNR Y308S libre de NADP^+* en la región de 515 nm es coherente con la ocupación completa del sitio activo por nicotinamida que se observó mediante los estudios cristalográficos del complejo FNR Y308S/ NADP^+ (sección 5.2.2.2). Además, la ausencia de perturbación en el espectro diferencial de *FNR Y308S conteniendo NADP^+ copurificado con la proteína* indicaría la existencia de un complejo 1 a 1, previamente al agregado de NADP^+ efectuado durante la medida de los mencionados espectros.

Los espectros diferenciales correspondientes a las tres variantes de FNR de arveja en complejo con NADP^+ resultaron cualitativamente similares pero difirieron extremadamente en la magnitud del pico en el entorno de 515 nm. La similitud cualitativa de los espectros puede interpretarse como un indicativo de la semejanza que exhibieron los tres complejos en cuanto a la geometría de la interacción nicotinamida-flavina (sección 5.2.2), mientras que la mayor magnitud de los picos para FNR Y308S y FNR Y308W sería una consecuencia de los mayores niveles de nicotinamida unida en el sitio activo. Si se asume que el espectro diferencial de formación del complejo FNR Y308S/ NADP^+ corresponde a una ocupación del 100% ($\Delta\epsilon_{506} = 3,99 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), los $\Delta\epsilon_{515}$ máximos de FNR Y308W y FNR silvestre permitirían estimar una ocupación del 40 % y el 14 % respectivamente (**Tabla 5.1**). El grado de ocupación de la nicotinamida en el complejo FNR Y308W/ NADP^+ determinado mediante estudios cristalográficos también resultó de 40 % (sección 5.2.2.4), apoyando de manera muy concreta la validez de esta asunción.

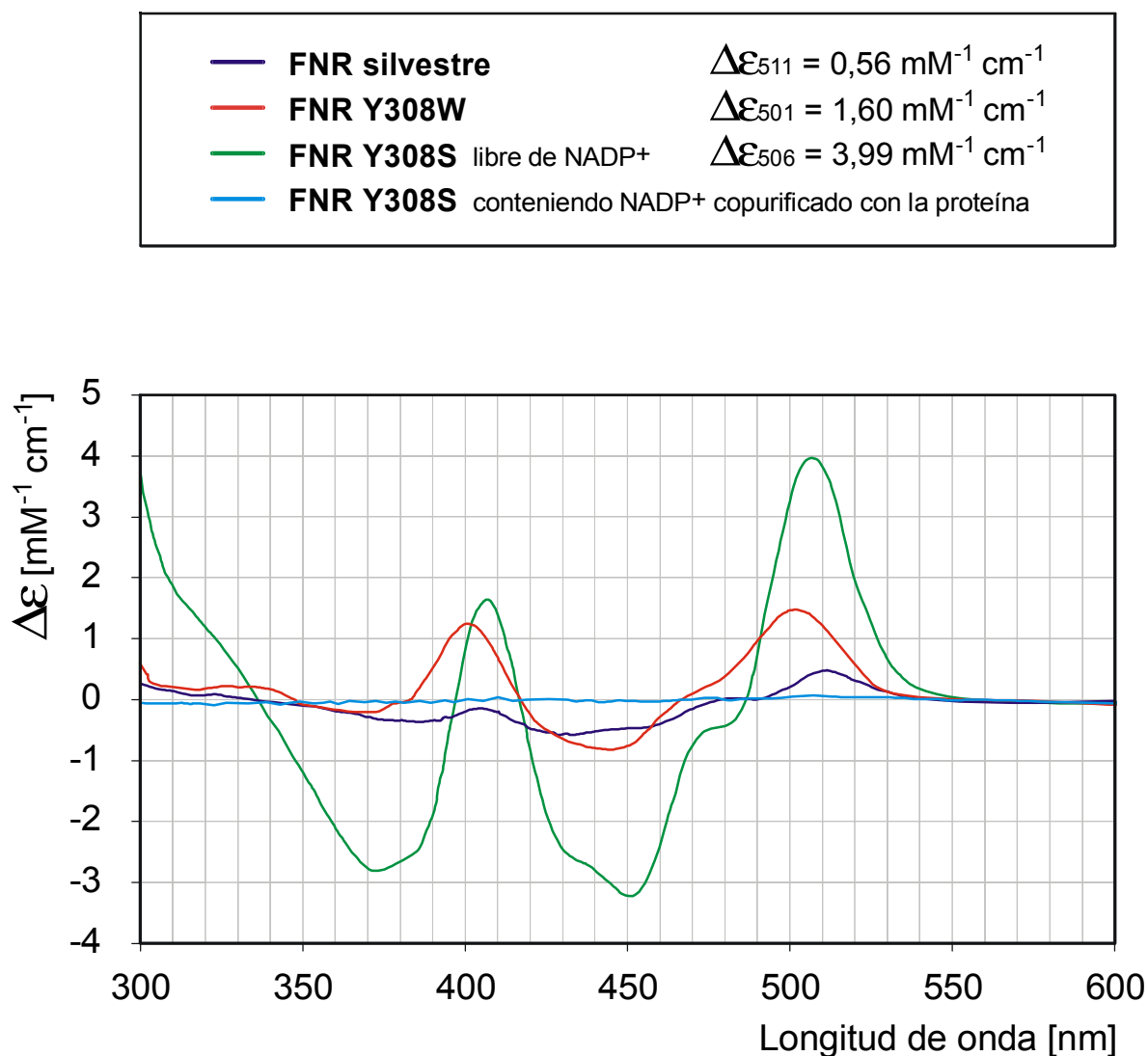


Figura 5.5 Espectros de absorción electrónica diferenciales de FNR silvestre, FNR Y308W y FNR Y308S debidos a la unión de NADP⁺. Cada espectro diferencial se calculó sustrayendo el espectro de la variante especificada de FNR y el espectro del NADP⁺, al espectro de FNR en presencia de concentraciones saturantes de NADP⁺ (1 mM). En el recuadro se indican los $\Delta\epsilon$ máximos en el entorno de 515 nm. Las condiciones experimentales se detallan en la sección 2.3.6 de Materiales y Métodos. El espectro diferencial identificado como *FNR Y308S conteniendo NADP⁺ copurificado con la proteína* está basado en titulaciones de la proteína purificada según el protocolo básico (sección 2.2.6 y 2.2.7), mientras que el identificado como *FNR Y308S libre de NADP⁺* corresponde a la misma preparación de proteína luego del tratamiento que remueve el NADP⁺ unido que se detalla en la sección 2.2.8.

Para cuantificar el aumento en la afinidad por NADP^+ provocado por la sustitución de la tirosina terminal se determinaron las constantes de disociación de los complejos FNR/ NADP^+ como se describe en la sección 2.3.6. En la **Tabla 5.1** se presentan las estimaciones de $K_d^{\text{NADP}^+}$ de FNR silvestre, FNR Y308W y FNR Y308S libre de NADP^+ . Confirmando las evidencias experimentales ya expuestas, la disminución de la $K_d^{\text{NADP}^+}$ de FNR Y308S resultó muy significativa. Sin embargo, los datos primarios obtenidos no pudieron ajustarse a un valor preciso debido a las limitaciones del método experimental empleado (sección 2.3.6), estableciéndose un límite superior de $0,2 \mu\text{M}$ para la $K_d^{\text{NADP}^+}$ de FNR Y308S. El aumento de afinidad en FNR Y308W fue más moderado, con una $K_d^{\text{NADP}^+}$ que disminuyó a un 60 % de la $K_d^{\text{NADP}^+}$ observada para FNR silvestre.

Finalmente, se estudió la interacción de las distintas variantes de FNR con NAD^+ . Sin embargo, sólo FNR Y308S produjo una perturbación detectable en el espectro diferencial (**Figura 5.6**). Como puede apreciarse comparando las **Figuras 5.5** y **5.6**, los espectros diferenciales de formación de los complejos FNR Y308S/ NADP^+ y FNR Y308S/ NAD^+ , fueron cualitativamente equivalentes. Asumiendo que el cambio espectral en el entorno de 515 nm no es dependiente del piridín nucleótido empleado, y que la perturbación máxima en esa región del espectro diferencial asociada a una ocupación del 100 % corresponde al complejo FNR Y308S/ NADP^+ , puede estimarse para esta mutante una ocupación del sitio activo por la nicotinamida del NAD^+ del 79 % (**Tabla 5.1**). La baja afinidad de FNR silvestre y FNR Y308W por NAD^+ sólo permitió establecer valores máximos para las $K_d^{\text{NAD}^+}$ (**Tabla 5.1**), que fueron impuestos por las limitaciones del método experimental empleado (sección 2.3.6). Por el contrario, la $K_d^{\text{NAD}^+}$ determinada para FNR Y308S resultó por lo menos 50 veces inferior a la de las

Tabla 5.1 Interacción de piridín nucleótidos con diferentes variantes de FNR. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos. Todos los errores estándar resultaron menores al 10 % de los valores estimados.

NADP ⁺	variante de FNR	ocupación del sitio activo por nicotinamida ^a [%]	K _d ^{NADP⁺} [μM]
	silvestre	14	9,3
	Y308W	40	5,5
	Y308S	100	<0,2 ^b

NAD ⁺	variante de FNR	ocupación del sitio activo por nicotinamida ^a [%]	K _d ^{NAD⁺} [μM]
	silvestre	nd ^c	>10000 ^b
	Y308W	nd ^c	>10000 ^b
	Y308S	79	190

^a Referido a un 100 % de ocupación por la nicotinamida en el complejo FNR Y308S/NADP⁺ ($\Delta\epsilon_{515}$ máximo = 3,99 mM⁻¹ cm⁻¹).

^b El método experimental empleado no permitió estimar los valores reales del parámetro.

^c n.d., no determinado.

Tabla 5.2 Parámetros cinéticos de la reacción NAD(P)H-K₃Fe(CN)₆ diaforasa catalizada por diferentes variantes de FNR. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos. Todos los errores estándar resultaron menores al 10 % de los valores estimados.

NADPH	variante de FNR	k _{cat} ^{NADPH} [s ⁻¹]	K _m ^{NADPH} [μM]	K _{esp} ^{NADPH} [μM ⁻¹ s ⁻¹]	$\frac{k_{esp}^{NADPH}}{K_{esp}^{NADPH}}$ variante de FNR
	silvestre	490	24	20	1,0
	Y308W	180	5,1	35	1,8
	Y308S	32	0,44	73	3,6

NADH	variante de FNR	k _{cat} ^{NADH} [s ⁻¹]	K _m ^{NADH} [μM]	K _{esp} ^{NADH} [μM ⁻¹ s ⁻¹]	$\frac{k_{esp}^{NADH}}{K_{esp}^{NADH}}$ variante de FNR
	silvestre	8,8	16000	0,00055	1,0
	Y308W	19,4	11400	0,0017	3,1
	Y308S	430	450	0,96	1700

NADPH NADH	variante de FNR	$\frac{k_{esp}^{NADPH}}{K_{esp}^{NADH}}$	$\frac{k_{esp}^{NADPH}}{K_{esp}^{NADH}}$ variante de FNR
	silvestre	37100	1,0
	Y308W	20700	1,8
	Y308S	76	490

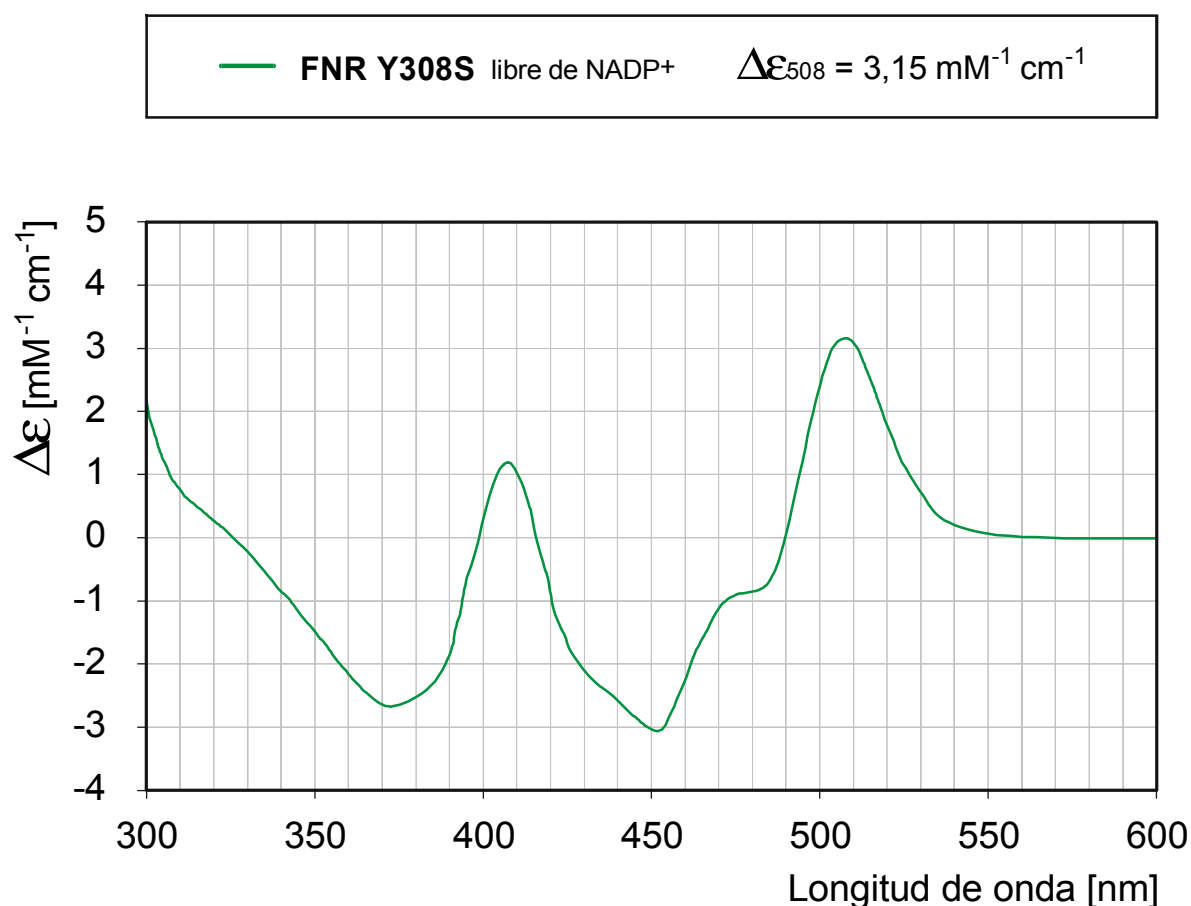


Figura 5.6 Espectro de absorción electrónica diferencial de FNR Y308S debido a la unión de NAD⁺. El espectro diferencial se calculó sustrayendo el espectro de FNR Y308S libre de NADP⁺ (sección 2.2.8) y el espectro del NAD⁺, al espectro de FNR en presencia de concentraciones saturantes de NAD⁺ (25 mM). En el recuadro se indica el $\Delta\epsilon$ máximo en el entorno de 515 nm. Las condiciones experimentales se detallan en la sección 2.3.6 de Materiales y Métodos.

otras variantes de FNR. Este resultado indica que la estabilización de la porción nicotinamida del sustrato producida por la eliminación de la cadena lateral aromática del residuo carboxilo terminal causó en FNR Y308S un importante aumento de la afinidad por la molécula completa de NAD^+ .

5.2.4 Especificidad para piridín nucleótidos de mutantes de ferredoxina- NADP^+ reductasa en el residuo Y308

Una vez demostrado el aumento de afinidad por NAD^+ en FNR Y308S, se decidió comprobar si las mutantes también habían incrementado su capacidad de emplear este piridín nucleótido como sustrato en la reacción diaforasa. Para ello se determinaron los parámetros cinéticos de FNR silvestre, FNR Y308W y FNR Y308S en las reacciones $\text{NADPH-K}_3\text{Fe(CN)}_6$ reductasa y $\text{NADH-K}_3\text{Fe(CN)}_6$ reductasa, ensayadas bajo las mismas condiciones (**Tabla 5.2**). Ambas mutantes mostraron un descenso de la k_{cat} y de la K_m en la actividad dependiente de NADPH. La disminución de las K_m fueron más importantes, por lo que las $k_{\text{esp}}^{\text{NADPH}}$ (equivalente a $k_{\text{cat}}^{\text{NADPH}} / K_m^{\text{NADPH}}$) aumentaron 1,8 y 3,6 veces para FNR Y308W y FNR Y308S respectivamente. En la actividad dependiente de NADH, ambas mutantes acusaron aumentos en la k_{cat} y descensos en la K_m , resultando en incrementos de 3,1 y 1700 veces en la $k_{\text{esp}}^{\text{NADH}}$ para FNR Y308W y FNR Y308S respectivamente. La $k_{\text{cat}}^{\text{NADH}}$ determinada para FNR Y308S aumentó unas 50 veces respecto a la $k_{\text{cat}}^{\text{NADH}}$ de FNR silvestre, alcanzando un valor similar a la $k_{\text{cat}}^{\text{NADPH}}$ de la enzima silvestre (**Tabla 5.2**). Esta observación sugiere que el descenso en la $k_{\text{cat}}^{\text{NADPH}}$ de las mutantes fue causado por la fuerte unión del NADP^+ en el sitio activo, luego de su generación como producto de la reacción diaforasa. De esta forma, en la hemi-reacción en la que el NADPH reduce a $\text{FNR}_{\text{oxidada}}$, la transferencia de hidruro dejaría de ser el paso limitante de velocidad, para serlo el paso de liberación del NADP^+ .

El parámetro más conveniente para medir la capacidad de discriminación de una enzima entre dos sustratos competidores es el cociente entre las k_{esp} para cada sustrato (168). Cuando los sustratos competidores son NADPH y NADH el cociente se denomina especificidad NADPH/NADH. En la **Tabla 5.2** puede observarse que este cociente es muy elevado para FNR silvestre ($k_{\text{esp}}^{\text{NADPH}} / k_{\text{esp}}^{\text{NADH}} = 37100$) indicando una fuerte preferencia por NADPH como sustrato. En la mutante FNR Y308W esta preferencia disminuye moderadamente ($k_{\text{esp}}^{\text{NADPH}} / k_{\text{esp}}^{\text{NADH}} = 20700$), mientras que en la mutante FNR Y308S la disminución se aproxima a 500 veces, con una preferencia por NADPH sólo 76 veces mayor que la ejercida por NADH.

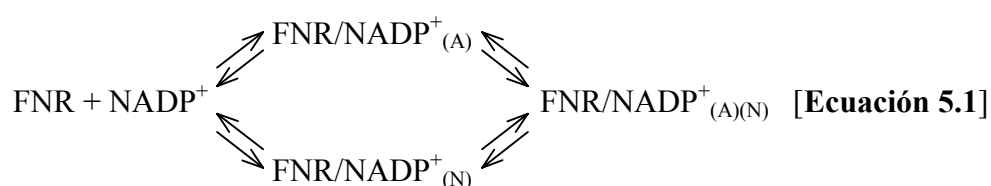
5.3 Discusión

5.3.1 Unión bipartita de NADP^+ a ferredoxina- NADP^+ reductasa

Las estructuras cristalinas de FNR Y308S y FNR Y308W en complejos con NADP(H) proporcionaron por primera vez una visión de la unión productiva del sustrato piridín nucleótido a FNR. Los resultados obtenidos indican que la conformación determinada es catalíticamente efectiva, y que la sustitución del residuo tirosina carboxilo terminal produce un aumento de la estabilidad de la interacción, sin afectar la geometría de unión del NADP(H). Las evidencias incluyen: i) las características globales de las perturbaciones espectrales inducidas por la unión de NADP^+ a las mutantes se asemejan a las de FNR silvestre (**Figura 5.5**), ii) las geometrías de los complejos FNR Y308S/ NADP^+ , FNR Y308S/NADPH y FNR Y308W/ NADP^+ son muy similares entre sí a pesar de las diferencias de los estados redox y de las mutaciones introducidas, iii) la nicotinamida enfrenta a la isoaloxazina su cara A, de acuerdo con la estereoquímica conocida para la transferencia de hidruro en FNR (104), y iv) el átomo C4 de la nicotinamida se localiza a 3,0-3,2 Å del átomo N5

de la flavina, en una disposición compatible con la transferencia de hidruro (**Figuras 5.2 y 5.4**).

Estos resultados sugieren que la unión de NADP^+ a FNR puede interpretarse como la unión casi independiente de las dos partes del dinucleótido, de manera similar a la descrita para glutatión reductasa (99) y alcohol deshidrogenasa (169). La parte 2'-P-AMP de la molécula se une muy fuertemente a FNR silvestre, con un $K_d = 2 \mu\text{M}$ para FNR de espinaca (91). Esta parte de la molécula proporciona un anclaje para el NADP(H) y determina la especificidad de sustrato (64). Por el contrario, los datos de espectroscopía diferencial (**Tabla 5.1**) indican que la nicotinamida, porción funcional del sustrato, estaría desordenada en un 86 %. La **Ecuación 5.1** describe el modelo más simple que explica este mecanismo de unión en dos pasos:



En esta ecuación, el subíndice representa la porción del dinucleótido unida al complejo binario FNR/NADP^+ , simbolizando con A la parte 2'-P-AMP y con N la parte nicotinamida del NADP^+ . Según este modelo, se esperaría que las mutaciones en la tirosina carboxilo terminal cambiasen las constantes de velocidad del equilibrio entre $\text{FNR/NADP}^+_{(A)}$ y $\text{FNR/NADP}^+_{(A)(N)}$, favoreciendo la unión completa del dinucleótido. Desafortunadamente, la interacción entre FNR y NADP^+ es demasiado veloz para ser estudiada mediante técnicas de reacción rápida (103).

Mediante titulación espectrofotométrica con NADP^+ se obtuvieron valores de $K_d^{\text{NADP}^+} = 9,3 \mu\text{M}$ para FNR silvestre y $K_d^{\text{NADP}^+} = 5,5 \mu\text{M}$ para FNR Y308W. Debido a la gran afinidad de FNR Y308S por NADP^+ no fue posible determinar con precisión la $K_d^{\text{NADP}^+}$ con las técnicas empleadas, sin embargo pudo estimarse un límite

superior de 0,2 μM . Ya que la fuerte unión del sustrato a FNR Y308S es contraproducente para la catálisis, es claro que una función importante del residuo Y308 es la modulación negativa de la afinidad para NADP^+ , proveyendo una cadena lateral que interacciona aún más fuertemente con el bolsillo de unión para nicotinamida.

La naturaleza bipartita de la unión del NADP^+ resalta una ambigüedad de las valoraciones basadas en medidas espectroscópicas sobre las interacciones estructurales de ligandos extendidos tales como los dinucleótidos. El débil espectro diferencial debido a la unión de NADP^+ a FNR silvestre no se debe a una interacción electrónica débil entre la nicotinamida y la flavina, sino que refleja una interacción que tiene una gran señal intrínseca en el espectro diferencial, pero que un momento determinado sólo ocurre en un 14 % de la población molecular. Este resultado puede generalizarse, indicando que la saturación del sitio de unión para un ligando suficientemente complejo, no implica necesariamente que tal sitio resulta plenamente ocupado por todas las porciones del ligando unido.

5.3.2 Anatomía del sitio activo

Existen cuatro residuos importantes del sitio activo de FNR que han sido analizados mediante mutagénesis sitio dirigida. A continuación se detalla entre barras la numeración de estos residuos para FNR de arveja, de espinaca y de *Anabaena*, indicando en negrita los residuos experimentalmente estudiados: S90/**S96**/S80 (128), C266/**C272**/C261 (129), E306/**E312**/**E301** (19, 119, 122, 130) y **Y308**/Y314/Y303 (127, 157). Los resultados presentados en este capítulo confirman que S90 y E306 están involucrados principalmente en la unión de nicotinamida más que en la reacción de transferencia de hidruro (**Figura 5.3**). Asimismo, el residuo C266 actuaría favoreciendo la geometría adecuada para la transferencia de hidruro mediante una restricción de la libertad conformacional de la nicotinamida (**Figura 5.3**). La reducida $k_{\text{cat}}^{\text{NADPH}}$ de FNR

Y308S había sido interpretada anteriormente como un indicativo del papel activo desempeñado por el residuo Y308 durante la catálisis (127, .65). Sin embargo, basándose en los nuevos resultados discutidos en este capítulo, resulta más factible que el descenso de actividad catalítica se deba a una disminución en la constante de velocidad de liberación del producto. Por lo tanto, se concluye que este residuo tirosina modularía la termodinámica de unión de la nicotinamida, pero no tendría una influencia directa sobre la conformación o la reactividad de la nicotinamida unida. Esta función contrasta con la determinada para el residuo Y197 en la glutatión reductasa humana, residuo que también resulta desplazado luego de la unión de la nicotinamida, pero participa activamente en la catálisis presionando la nicotinamida contra la flavina (100, 170).

5.3.3 Modulación de la especificidad NADPH/NADH por el residuo tirosina carboxilo terminal

Los análisis previos de la especificidad NADPH/NADH en deshidrogenasas NAD(P)H dependientes se habían enfocado exclusivamente en el reconocimiento del grupo 2'-fosfato o 2'-hidroxilo del piridín nucleótido (171-181). Este enfoque se justifica plenamente, ya que el grupo en posición 2' constituye el único rasgo que diferencia la molécula de NADP(H) de la molécula de NAD(H). Por el contrario, las mutantes de FNR analizadas en este capítulo poseen reemplazos en el residuo Y308, localizado exactamente en el sitio de unión para la porción del dinucleótido que resulta idéntica en NADP(H) y NAD(H). Un análisis superficial podría indicar que no es razonable esperar grandes alteraciones de la especificidad NADPH/NADH en estas mutantes de FNR. Sin embargo, considerando el modelo de unión bipartita del NADP^+ a FNR (**Ecuación 5.1**) y los incrementos en la afinidad por NADP^+ detectados en las mutantes (**Tabla 5.1**), se decidió investigar si la estabilización de la porción nicotinamida del dinucleótido

afectaba también la afinidad y la especificidad de las mutantes por NAD^+ . Esta hipótesis fue ampliamente confirmada para la mutante FNR Y308S, que resultó capaz de interaccionar con NAD^+ con una $K_d^{\text{NAD}^+} = 190 \mu\text{M}$ y una ocupación del sitio activo por nicotinamida del 79 %. Sin embargo, el resultado más relevante fue la disminución de casi 500 veces en la especificidad NADPH/NADH determinada para esta mutante de FNR (**Tabla 5.2**). Vale aclarar que el descenso en la preferencia por NADPH como sustrato de FNR Y308S se debió enteramente al gran incremento en la $k_{\text{esp}}^{\text{NADH}}$ (1700 veces), ya que la $k_{\text{esp}}^{\text{NADPH}}$ también experimentó un aumento respecto a la de la enzima silvestre (3,6 veces). Así, la característica que distingue a los resultados obtenidos con estas mutantes es que el gran descenso de especificidad NADPH/NADH se logró merced a un aumento de la actividad dependiente de NADH, sin anular la actividad dependiente de NADPH. La experiencia acumulada en los estudios de mutagénesis dirigida con FNR indican que aunque es relativamente sencillo reducir la capacidad de interacción de la enzima con NADP^+ , resulta muy difícil obtener una unión más eficiente de NAD^+ (181).

Tanto en la actividad dependiente de NADPH, como en la dependiente de NADH, ambas mutantes mostraron descensos de la K_m que se correlacionaron con descensos en la K_d y con aumentos de la ocupación del sitio activo por nicotinamida en los complejos respectivos (exceptuando los casos en los que los parámetros no pudieron ser determinados). Aunque las $k_{\text{cat}}^{\text{NADPH}}$ de las mutantes disminuyeron por la dificultad para liberar el producto NADP^+ derivada del aumento de afinidad por el mismo, no sucedió lo mismo con las $k_{\text{cat}}^{\text{NADH}}$. Esto probablemente se debe a que cada forma de FNR posee una afinidad por NAD^+ aproximadamente 1000 veces menor a la afinidad por NADP^+ (**Tabla 5.1**). Por lo tanto, la liberación del producto no se convierte en un

paso limitante en la reacción dependiente de NAD^+ , y las $k_{\text{cat}}^{\text{NADH}}$ no resultan afectadas negativamente.

Un resultado que merece discusión es la reducida $k_{\text{cat}}^{\text{NADH}}$ de FNR silvestre, y el hecho que la sustitución de Y308 haya incrementado este valor. Aunque no fue posible obtener una medida directa de la ocupación del sitio activo por nicotinamida en el complejo FNR silvestre/ NAD^+ debido a la elevada $K_d^{\text{NAD}^+}$ de este complejo (**Tabla 5.1**), la información presentada en este capítulo sugiere que el nivel de ocupación sería muy bajo. Por lo tanto, la interacción con el 2'-fosfato del piridín nucleótido sería requerida no sólo para alcanzar un valor de K_d compatible con la catálisis, sino también para anclar el sustrato en una orientación favorable para el posicionamiento correcto de la nicotinamida en el sitio activo, tal como es requerido para una rápida transferencia de hidruro. En ausencia de este anclaje, la porción AMP de la molécula de NADH se uniría en una orientación que no permitiría un ingreso eficiente de la nicotinamida al sitio activo. En la mutante FNR Y308S, la unión de la nicotinamida se convertiría en la interacción dominante que favorece la fijación de la molécula de NADH a la enzima, y por lo tanto la nicotinamida ya no sería incorrectamente posicionada por la unión de la parte AMP del dinucleótido. La consecuencia de la correcta ubicación de la porción nicotinamida en el sitio activo de FNR Y308S sería una $k_{\text{cat}}^{\text{NADH}}$ similar a la $k_{\text{cat}}^{\text{NADPH}}$ de FNR silvestre (**Tabla 5.2**).

En conclusión, estos resultados ilustran la forma en que puede resolverse el problema de la discriminación entre sustratos muy similares por parte de una enzima. En FNR la discriminación entre NADP(H) y NAD(H) se establece gracias a dos determinantes. El denominado PRIMER DETERMINANTE en el modelo presentado en la **Figura 5.7** realiza el reconocimiento específico y establece fuertes interacciones con el grupo diferencial, es decir el 2'-fosfato. El SEGUNDO DETERMINANTE está

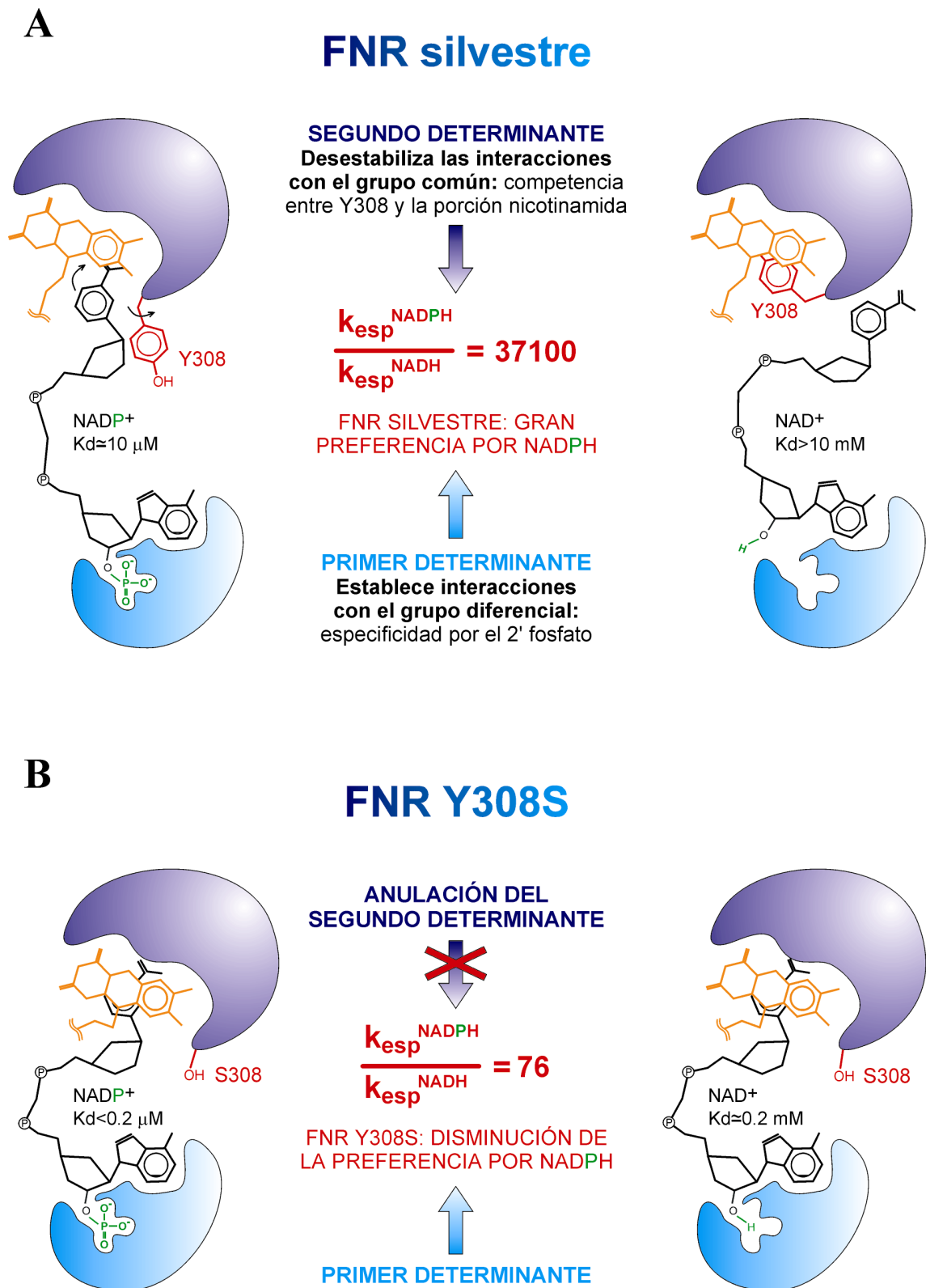


Figura 5.7 Determinantes estructurales que definen la especificidad NADPH/NADH en FNR. El modelo se explica con detalle en el texto. **A**, FNR silvestre. **B**, FNR Y308S.

constituido por la tirosina 308, que compite por la misma ubicación en el sitio activo con el grupo común a ambos sustratos, es decir el anillo de nicotinamida. Ambos determinantes contribuyen a la gran preferencia que exhibe FNR silvestre por NADPH (**Figura 5.7.A**). En la mutante FNR Y308S el SEGUNDO DETERMINANTE resulta anulado, lo que ocasiona un descenso de unas 500 veces en la preferencia de la enzima por NADPH (**Figura 5.7.B**). El papel de Y308 como determinante de la especificidad NADPH/NADH en FNR provee un argumento adicional para explicar la gran conservación de este residuo entre las secuencias de FNR plastídicas conocidas hasta la fecha (**Figura 3.1**). Como una conclusión más general, puede señalarse que cuando se intenta alterar la capacidad de una proteína para discriminar entre dos ligandos similares, aún resulta razonable dirigir la atención hacia las interacciones con porciones que son comunes a ambos ligandos.

6 MODELIZACIÓN DEL ENTORNO AROMÁTICO DE LA ISOALOXAZINA EN LA FERREDOXINA-NADP⁺ REDUCTASA

6.1 Introducción

Desde que las interacciones entre residuos aromáticos o interacciones π - π se propusieron como una nueva clase de fuerza estabilizadora de la estructura proteica (sección 1.2.6.2, 83) se han llevado a cabo estudios teóricos (84, 182), estrategias experimentales basadas en mutagénesis sitio dirigida (183) o en la síntesis de compuestos aromáticos modelo (184), análisis estadísticos de las bases de datos estructurales (86, 185), así como estudios que combinan más de uno de estos enfoques (85), todos persiguiendo objetivos similares. Entre ellos se destacan la determinación de las geometrías de interacción más estables entre anillos aromáticos, la búsqueda de las condiciones que permiten el establecimiento de dichas interacciones y la racionalización de estas condiciones. Sin embargo, el análisis de las interacciones π - π en proteínas se ha enfocado principalmente en las cadenas laterales de los aminoácidos tirosina, fenilalanina y triptofano. El análisis de todas las estructuras de flavoproteínas depositadas actualmente en la base de datos PDB (sección 2.1.4) permite afirmar que aproximadamente una cuarta parte de las mismas presentan al menos un residuo aromático en el entorno de la flavina. Sin embargo, hasta el presente no existen en la literatura estudios teóricos de la interacción entre residuos aromáticos y flavinas en proteínas.

En la superfamilia FNR todos los miembros cuyas estructuras tridimensionales han sido resueltas poseen un residuo tirosina cercano a la cara *si* de la flavina, homólogo al residuo Y89 de FNR de arveja, y en seis de las estructuras también se encuentra un residuo aromático enfrentado a la cara *re* de la flavina, homólogo al

Tabla 6.1 Residuos aromáticos enfrentados a la flavina en las estructuras de flavoproteínas silvestres pertenecientes a la superfamilia ferredoxina-NADP⁺ reductasa.

Ident. PDB ^a	PROTEÍNA	Grupo Prostético	ORGANISMO	cara <i>si</i> del grupo prostético				cara <i>re</i> del grupo prostético			
				residuo	Áng. [°] ^b	Anillo ^c	Dist. [Å] ^d	residuo	Áng. [°] ^b	Anillo ^c	Dist. [Å] ^d
1QG0 ^e	ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	FAD	<i>Pisum sativum</i>	Y89	54	C	4,6	Y308	5	B	3,7
1FNB	ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	FAD	<i>Spinacia oleracea</i>	Y95	57	C	4,6	Y314	1	B	3,7
1QUE	ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	FAD	<i>Anabaena</i> PCC7119	Y79	62	C	4,6	Y303	6	B	3,6
1FDR	flavodoxina-NADP ⁺ reductasa	FAD	<i>Escherichia coli</i>	Y52	67	C	4,7	Y247	15	B	3,6
1A8P	flavodoxina-NADP ⁺ reductasa	FAD	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Y53	35	C	4,0				
2CND	nitrato reductasa (dominio citocromo c reductasa)	FAD	<i>Zea mays</i>	Y64	55	C	4,8				
1CQX ^e	flavo-hemoglobina	FAD	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Y208	68	C	4,6				
1NDH	citocromo b5 reductasa	FAD	<i>Sus crofa</i>	Y65	63	C	4,6				
1AMO ^e	NADPH citocromo P450 reductasa (dominio FAD)	FAD	<i>Rattus norvegicus</i>	Y456	65	C	4,8	W677	5	B	3,7
2PIA	ftalato dioxigenasa reductasa	FMN	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Y57	88	C	4,8	F225	6	B	3,4

^a Identificador de la estructura en la base de datos PDB.^b Ángulo formado entre el plano de la cadena lateral del residuo y el plano de la flavina.^c Anillo A, B o C de la isoaloxazina más cercano a la cadena lateral del residuo^d Distancia entre el centroide de la cadena lateral del residuo y el centroide del anillo más cercano de la isoaloxazina.^e Estructuras con dos monómeros en la unidad asimétrica. Se informan los valores promedio de los parámetros medidos.

residuo Y308 de la misma enzima. Como se observa en la **Tabla 6.1**, las disposiciones de estos residuos aromáticos respecto a la flavina muestran algunas tendencias marcadas: 1) en ocho de las diez estructuras los ángulos diedros de la cadena lateral de la tirosina homóloga a Y89 adoptan un valor en el intervalo de $61^\circ \pm 7^\circ$; 2) la tirosina homóloga a Y89 se ubica en las cercanías del anillo C de la flavina a una distancia medida entre los centroides de los anillos de 4,6 Å a 4,8 Å, con excepción de Y53 de FPR de *Azotobacter vinelandii* que se ubica a 4 Å; 3) la cadena lateral del residuo homólogo a Y308 se orienta en forma casi coplanar con la flavina, con ángulos diedros en el intervalo de $8^\circ \pm 7^\circ$; y 4) la distancia entre centroides que separa al residuo homólogo a Y308 del anillo B, el más cercano al residuo, resulta de 3,4 Å a 3,7 Å. Ambos residuos se encuentran a una distancia de la flavina en el rango de 3,4 Å a 6 Å, indicando que establecen una interacción de tipo aromático con el grupo prostético (sección 1.2.6.2).

La conservación de la geometría que evidencia la **Tabla 6.1**, podría deberse a una interacción estabilizante entre la cadena lateral del residuo aromático y la flavina, a una restricción impuesta por el plegamiento de la proteína, o a una combinación de ambos factores. Los métodos de modelado molecular *ab initio* resultan particularmente apropiados para analizar la primera de las posibilidades mencionadas (186). Estos consisten en cálculos mecánico-cuánticos en los cuales los orbitales electrónicos son computados como la suma de un conjunto de funciones primitivas denominadas conjunto de bases. La elección de un conjunto de bases determinado está supeditada principalmente al poder computacional disponible y a la precisión deseada en los resultados. La información primaria que se obtiene consiste básicamente en el valor de energía absoluta y la matriz que define a los orbitales moleculares del sistema. En general, los cálculos *ab initio* sólo son factibles para sistemas con un número de átomos

mucho menor al que pueden tratar otros métodos como los basados en mecánica molecular.

En la cuarta etapa de este trabajo de Tesis se analizaron las interacciones entre la flavina del grupo prostético y las cadenas laterales de Y89 y Y308 de FNR de arveja desde un punto de vista teórico, mediante cálculos *ab initio* de un sistema modelo constituido por dos moléculas de fenol y una de isoaloxazina.

6.2 Resultados

6.2.1 Interacciones π - π entre aminoácidos aromáticos y la isoaloxazina en ferredoxina-NADP⁺ reductasa

El entorno aromático de la flavina de FNR silvestre de arveja se modeló mediante el sistema de moléculas descrito en la **Figura 6.1**. Debido a que en los métodos *ab initio* empleados (sección 2.1.5) el tiempo de cómputo y la capacidad de almacenamiento necesaria para los archivos auxiliares aumenta aproximadamente según la cuarta potencia del número de electrones, se trató de minimizar el número de átomos en el sistema (186). De este modo, las cadenas laterales de Y89 y Y308 se reemplazaron con moléculas de fenol, y el triple anillo de lumicromo del FAD fue modelado mediante una molécula de isoaloxazina, sustituyendo a los grupos metilos de los átomos C8 y C7 del anillo A por átomos de hidrógeno. Estas simplificaciones redujeron el sistema a un conjunto de 48 átomos (210 electrones) en un arreglo de 3 moléculas cuya disposición en el espacio se derivó de las coordenadas cristalográficas del monómero A en la estructura de FNR silvestre de arveja (Identificador PDB: 1QG0). Los átomos de hidrógeno se ubicaron en las posiciones que corresponden a las estructuras de mínima energía de cada molécula aislada, con excepción de los hidrógenos de los grupos hidroxilo de las moléculas de fenol. En la molécula FENOL89 el hidrógeno se dispuso

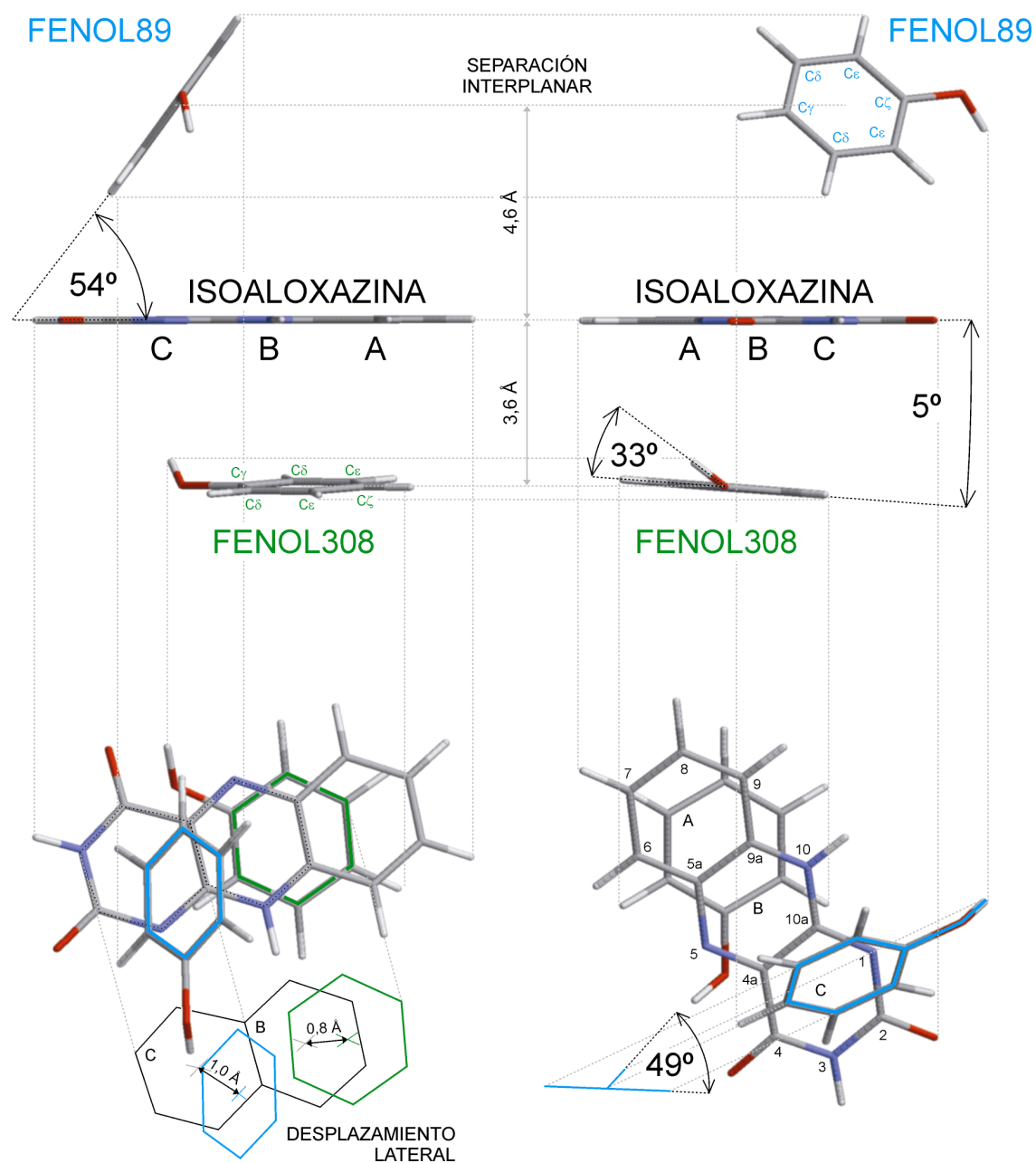


Figura 6.1 Diferentes vistas del arreglo molecular que modela la parte flavina del grupo prostético FAD y las cadenas laterales de los residuos Y89 y Y308 en FNR de arveja. Para facilitar la comparación con el sistema modelado se identificaron los átomos del sistema empleando la nomenclatura estándar para el aminoácido tirosina y el grupo prostético FAD. La disposición espacial de las moléculas se derivó de las coordenadas cristalográficas del monómero A en la estructura de identificador PDB: 1QG0.

conservando las distancias estándar de enlace con el oxígeno, pero orientando el mismo según un ángulo de 49° respecto al anillo aromático (vista inferior derecha en la **Figura 6.1**). De esta forma se mantiene el enlace en la dirección del puente de hidrógeno que forma el hidroxilo de Y89 con el átomo C4 de la porción ribitilo del FAD (secciones **1.2.6.1**, **4.3** y **5.2.2.1**). De manera análoga, el enlace hidrógeno-oxígeno de la molécula FENOL308 se orientó en un ángulo de 33° (vista superior derecha en la **Figura 6.1**) manteniendo la dirección del puente de hidrógeno que forma el grupo hidroxilo del residuo Y308 con la molécula de agua 2088. Además del sistema completo compuesto por las tres moléculas, se estudiaron las moléculas aisladas, y los pares FENOL89/ISOALOXAZINA y FENOL308/ISOALOXAZINA.

Los cálculos mecánico-cuánticos de los sistemas modelo se realizaron empleando un nivel de teoría Hartree-Fock restringido 3-21G** (sección **2.1.5**). Hubiera sido deseable alcanzar un nivel de teoría 6-31G**, ya que ha resultado adecuada para cálculos de flavinas (187), pero no fue posible debido a las limitaciones de los recursos computacionales disponibles. Por la misma razón no pudo aplicarse el método de interacción de configuraciones o la teoría perturbativa de Møller-Plesset para corregir la energía de correlación luego del tratamiento de Hartree-Fock (186). Los cálculos fueron del tipo punto simple, ya que se determinó la energía total y la distribución electrónica del sistema molecular en una configuración específica que representa un punto en la superficie de energía.

En la **Tabla 6.2** pueden observarse los valores de energía total de cada sistema que resultaron de los cálculos *ab initio*. Las energías relativas resultan de mayor interés que las energías absolutas, ya que permiten comparar el aporte de cada interacción a la estabilidad del sistema completo. La molécula de FENOL308 se mostró más estable que el FENOL89 (-0,39 kcal/mol) debido a que se aleja menos de la

Tabla 6.2 Estimación de energía total de los sistemas mediante cálculos *ab initio*.

Moléculas en el sistema modelado ^a	Energía Total [Kcal/mol]	Δ Energía ^b [Kcal/mol]
FENOL89	-190696,67	
FENOL308	-190697,06	-0,39
ISOALOXAZINA	-467837,39	
FENOL89 + ISOALOXAZINA	-658534,06	
FENOL89/ISOALOXAZINA	-658536,08	-2,02
FENOL308 + ISOALOXAZINA	-658534,45	
FENOL308/ISOALOXAZINA	-658536,10	-1,65
FENOL89 + FENOL308 + ISOALOXAZINA	-849231,12	
FENOL89/FENOL308/ISOALOXAZINA	-849234,84	-3,72

^a Los sistemas separados por un signo de suma (+) se calcularon en forma independiente y se muestra la suma de sus energías totales. Las moléculas separadas por una barra (/) conforman un mismo sistema.

^b Diferencia de energía respecto al sistema de la fila inmediata superior.

Tabla 6.3 Orbitales moleculares que evidencian deslocalización de electrones π entre las moléculas FENOL308 e ISOALOXAZINA.

ORBITAL MOLECULAR		CONTRIBUCIÓN DE ORBITALES π AL ORBITAL MOLECULAR [%]			ENERGÍA DEL ORBITAL MOLECULAR [eV]
Descripción	número	FENOL308	ISOALOXAZINA	TOTAL	
π - π	109	22	47	69	3,63
π - π	108	44	27	71	3,36
	107				2,71
LUMO	106				0,43
HOMO	105				-8,40
	104				-8,62
	103				-8,72
	102				-9,28
π - π	101	66	8	74	-9,55
π - π	100	10	49	59	-9,92

estructura de mínima energía conocida para el fenol, que es completamente planar. Las interacciones de la ISOALOXAZINA con una u otra de las moléculas de FENOL resultaron atractivas, sin embargo la interacción con el FENOL89 fue más estabilizante (-2,02 kcal/mol) que la interacción con el FENOL308 (-1,65 kcal/mol). Si se compara la estabilización total debida a la interacción independiente de cada FENOL con ISOALOXAZINA $[-2,02 \text{ kcal/mol} + (-1,65 \text{ kcal/mol}) = -3,67 \text{ kcal/mol}]$ con la estabilización debida a la formación del arreglo completo de las tres moléculas $[-3,72 \text{ kcal/mol}]$ puede concluirse que en el sistema estudiado el aporte de cada molécula de FENOL a la estabilización total es prácticamente aditivo $[-3,72 \text{ kcal/mol} - (-3,67 \text{ kcal/mol}) = -0,05 \text{ kcal/mol}]$. Es importante mencionar que el cálculo de la energía relativa de un sistema multimolecular a partir de la diferencia entre su energía absoluta y las energías absolutas de las moléculas que lo componen, puede realizarse dado que el método de cálculo empleado respeta la llamada *consistencia de tamaño*. La *consistencia de tamaño* implica que la energía absoluta computada para un sistema compuesto por n subsistemas infinitamente separados en el espacio es coincidente con la suma de las energías calculadas para los n subsistemas aislados (188). Este parece ser un requerimiento más que modesto para un método que evalúe energías, sin embargo no todos los modelos teóricos gozan de esta propiedad. Por ejemplo, el método de interacción de configuraciones incompleto empleado para corregir el error debido a la energía de correlación inherente a la energía de Hartree-Fock, no mantiene la consistencia de tamaño (188).

Una vez determinada la naturaleza atractiva de la interacción entre el FENOL308 y la ISOALOXAZINA (**Tabla 6.1**), se analizaron las cargas electrónicas de Mulliken sobre cada átomo de estas moléculas con el objeto de determinar si existía una componente electrostática en la misma. Sin embargo, no se encontró una

complementariedad entre las cargas electrónicas de los átomos enfrentados en cada una de las moléculas. Seguidamente, se estudió el aporte de la deslocalización de electrones π entre las dos moléculas en el establecimiento de la interacción. Con ese fin se analizó la matriz de coeficientes de los orbitales moleculares del sistema formado por FENOL89, ISOALOXAZINA y FENOL308, mediante el tratamiento automatizado del archivo de registro generado durante los cálculos (sección 2.1.5.1). Como los orbitales moleculares son combinaciones lineales de los orbitales atómicos (186), la matriz que los define consiste de 129600 coeficientes (360×360) que indican la contribución de cada uno de los 360 orbitales atómicos a cada uno de los 360 orbitales moleculares. Esta matriz se procesó para detectar aquellos orbitales moleculares que cumpliesen con las siguientes condiciones: 1) la contribución de los orbitales atómicos del tipo p_z al orbital molecular debía ser mayor al 50 % (se orientó el sistema de modo que los orbitales p_z fueran perpendiculares al plano de la isoaloxazina), calculando esta contribución para cada orbital molecular como el cociente entre la sumatoria de coeficientes al cuadrado correspondientes a orbitales p_z y la sumatoria de coeficientes al cuadrado correspondientes a todos los orbitales atómicos; 2) la contribución de los orbitales atómicos p_z debía provenir de ambas moléculas (FENOL308 e ISOALOXAZINA), fijándose un umbral de contribución mínima del 5 % para cada una de las mismas.

Como se muestra en la **Tabla 6.3**, se encontraron cuatro orbitales moleculares que cumplieron con ambos requisitos. Estos fueron los orbitales moleculares enlazantes número 100 (HOMO - 4) y 101 (HOMO - 5), y los orbitales moleculares antienlazantes número 108 (LUMO + 2) y 109 (LUMO + 3), todos ellos con energías cercanas a las energías de los orbitales de frontera (HOMO y LUMO). En la **Figura 6.2** puede observarse una representación gráfica de los dos orbitales

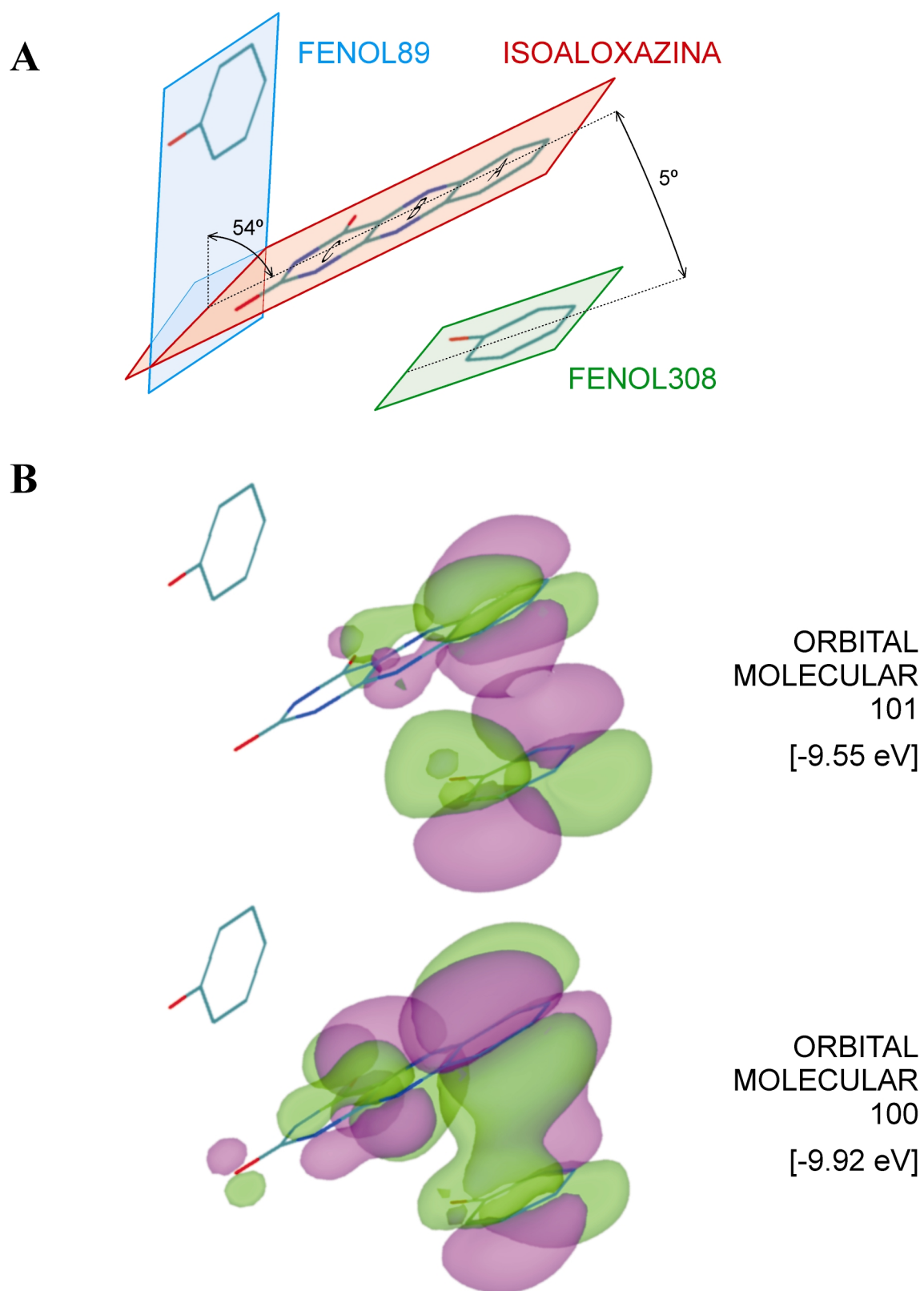


Figura 6.2 Representación de los orbitales moleculares enlazantes que evidencian la deslocalización de electrones π entre el FENOL308 y la ISOALOXAZINA. **A**, Esquema del sistema molecular calculado (representado con más detalles en la Figura 6.1). **B**, Orbitales moleculares enlazantes número 101 (HOMO - 4) y número 100 (HOMO - 5) contorneados a un nivel de densidad electrónica de $0,01 \text{ e/a}_0^3$.

moleculares enlazantes que ponen de manifiesto la deslocalización de electrones π entre el anillo aromático del FENOL308 y el anillo A de la ISOALOXAZINA.

6.2.2 Curvas de energía potencial asociadas a la rotación de la cadena lateral de los residuos aromáticos cercanos a la isoaloxazina

Con el fin de estudiar los factores que gobiernan la geometría del arreglo de tirosinas enfrentadas a la flavina en FNR, se computaron las curvas de energía potencial asociadas a la rotación del FENOL89 o del FENOL308, manteniendo constantes las distancias respecto a la ISOALOXAZINA. Dado que la estabilización del sistema modelo debida a la interacción de cada FENOL con la ISOALOXAZINA resultó aproximadamente aditiva (**Tabla 6.2**), pueden analizarse los sistemas FENOL89/ISOALOXAZINA y FENOL308/ISOALOXAZINA independientemente, con el consiguiente ahorro en los tiempos de cómputo. Debe mencionarse que el cálculo de cada punto simple en las curvas de energía potencial de los sistemas FENOL/ISOALOXAZINA insumió de 4 a 10 horas de procesamiento en el equipo descrito en la sección **2.1.5.1**, mientras que para el sistema trimolecular cada punto simple hubiera requerido aproximadamente un día completo de cómputo. Los sistemas evaluados estaban compuestos por la molécula de ISOALOXAZINA y el FENOL89 o el FENOL308, dispuestos como se detalla en la **Figura 6.1**. A partir de estos sistemas se generaron en primer lugar familias de sistemas en los que se varió el ángulo diedro entre las dos moléculas mediante la rotación del FENOL sobre el eje $C\gamma-C\zeta$, manteniendo constantes la orientación del enlace O-H del FENOL respecto al plano de la flavina. El ángulo diedro no se varió uniformemente, sino que se aumentó la resolución angular en los entornos cercanos a los máximos y a los mínimos de energía, incrementando así el número de determinaciones en estas regiones.

En la **Figura 6.3.A** se esquematiza la disposición del sistema FENOL89/ISOALOXAZINA en el que las moléculas forman un ángulo diedro de 54° , coincidente con el observado para la cadena lateral de Y89 respecto a la flavina en FNR de arveja. El mínimo global en la curva de energía potencial de la **Figura 6.3.B** correspondió al sistema con un ángulo diedro de 63° y una energía relativa de $-2,08$ kcal/mol. El punto en la curva de energía potencial asociado al sistema de la **Figura 6.3.A** (en rojo) se ubicó muy próximo al mínimo global, con una energía relativa de $-2,02$ kcal/mol. Si bien el ángulo diedro determinado entre Y89 y la flavina difiere en un 15 % con el ángulo asociado al mínimo teórico de energía, vale mencionar que en el rango de 55° a 73° de la curva se produce una variación de sólo $0,06$ kcal/mol. La **Figura 6.4.A** ilustra el sistema FENOL308/ISOALOXAZINA con un ángulo diedro de 5° , como el que se observa para la cadena lateral de Y308 en FNR de arveja. La curva de energía potencial de la **Figura 6.4.B** muestra su mínimo global en un ángulo diedro de 2° , con una energía relativa de $-1,69$ kcal/mol. La energía relativa del sistema con un ángulo diedro coincidente con el observado para la cadena lateral del residuo modelado resultó de $-1,65$ kcal/mol (**Figura 6.4.B**, en rojo), muy cercana al mínimo global.

Seguidamente, se analizó la influencia que ejercía la distancia entre el FENOL y la ISOALOXAZINA sobre la magnitud del ángulo diedro adoptado en la configuración de mínima energía. Con este fin, se computaron las curvas de energía potencial asociadas a la rotación de cada FENOL en sistemas en los que la ISOALOXAZINA se desplazó 1 \AA , acercándose al FENOL89 y alejándose del FENOL308. De este modo, en el nuevo sistema la distancia que media entre el centroide del FENOL89 y la ISOALOXAZINA se reduce de $4,6 \text{ \AA}$ a $3,6 \text{ \AA}$, y la que separa el centroide del FENOL308 y la ISOALOXAZINA se incrementa de $3,6 \text{ \AA}$ a $4,6 \text{ \AA}$ (**Figura 6.5.A**). En la **Figura 6.5.B** se graficaron las curvas de energía potencial

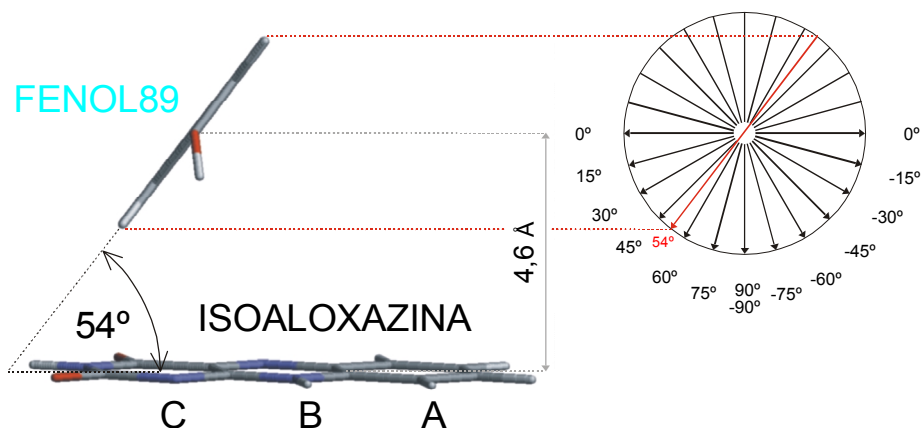
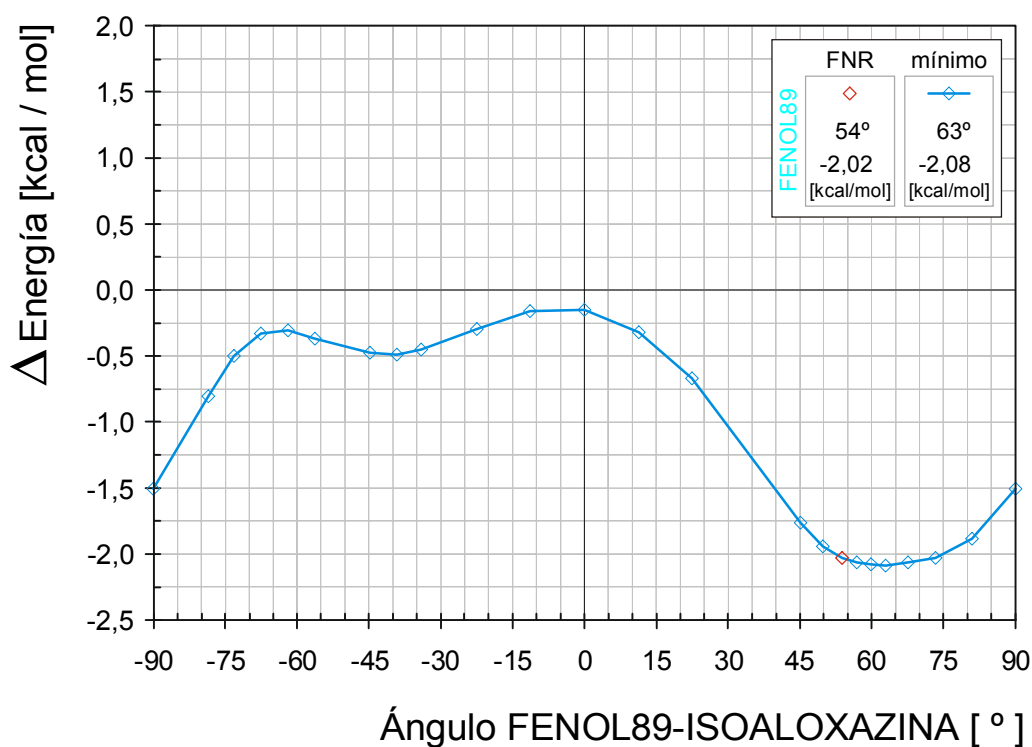
A**B**

Figura 6.3 Curva de energía potencial asociada a la rotación del FENOL89. **A**, Esquema del sistema calculado, equivalente al representado en la Figura 6.1 sin la molécula de FENOL308. Se indica la convención empleada para definir los ángulos de rotación sobre el eje $C\gamma-C\zeta$ del FENOL89. **B**, Diagrama de energía potencial en función del ángulo diedro formado entre el FENOL89 y el plano de la ISOALOXAZINA. Se indican con rombos los puntos de la curva calculados, remarcando en rojo el que corresponde al sistema que modela la disposición de Y89 observada en la estructura cristalográfica de FNR de arveja. Cada diferencia de energía se calculó con respecto a un sistema en cual las moléculas de FENOL89 e ISOALOXAZINA se encontraban infinitamente alejadas en el espacio.

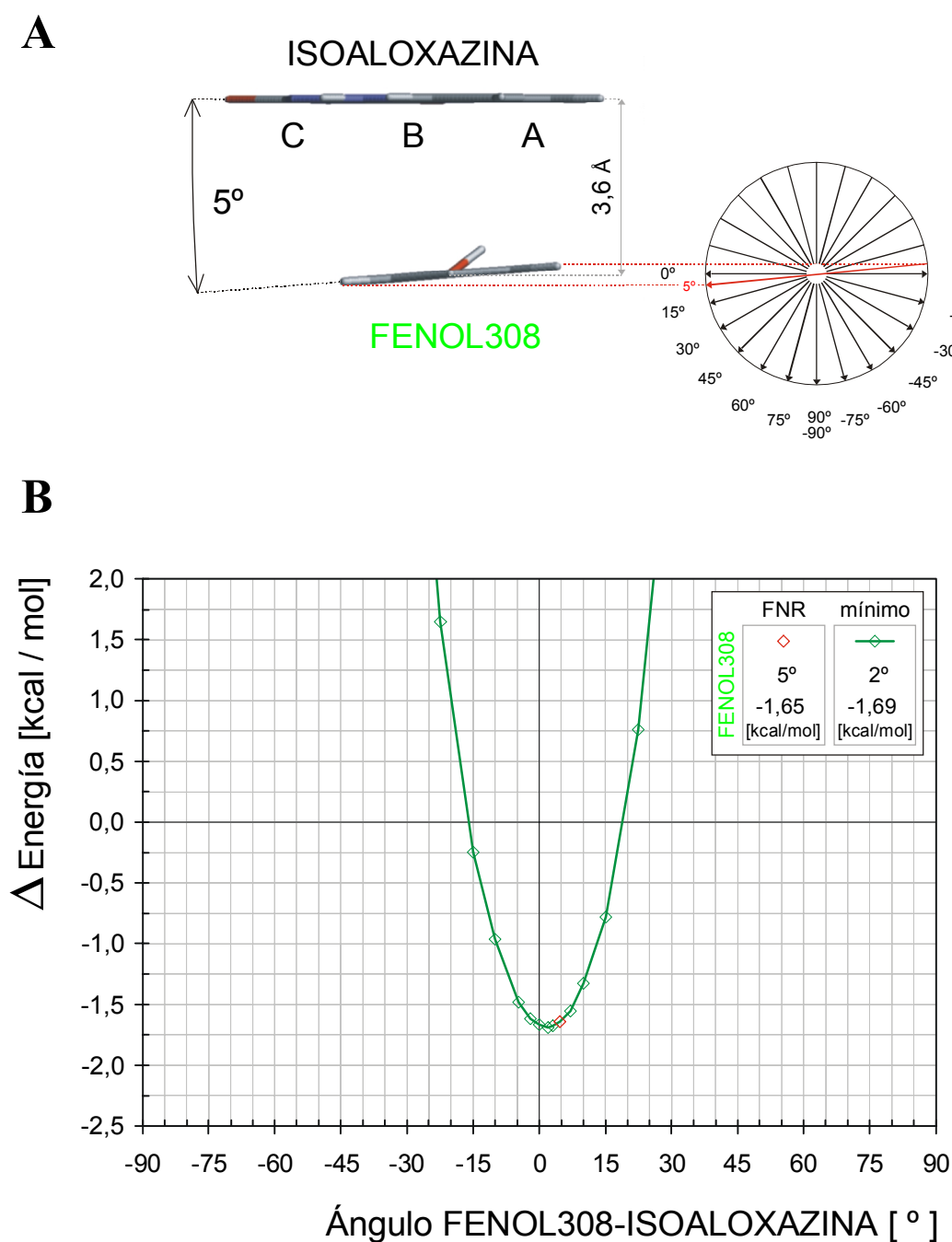


Figura 6.4 Curva de energía potencial asociada a la rotación del FENOL308. **A**, Esquema del sistema calculado, equivalente al representado en la Figura 6.1 sin la molécula de FENOL89. Se indica la convención empleada para definir los ángulos de rotación sobre el eje $C\gamma-C\zeta$ del FENOL308. **B**, Diagrama de energía potencial en función del ángulo diedro formado entre el FENOL308 y el plano de la ISOALOXAZINA. Se indican con rombos los puntos de la curva calculados, remarcando en rojo el que corresponde al sistema que modela la disposición de Y308 observada en la estructura cristalográfica de FNR de arveja. Cada diferencia de energía se calculó con respecto a un sistema en cual las moléculas de FENOL308 e ISOALOXAZINA se encontraban infinitamente alejadas en el espacio.

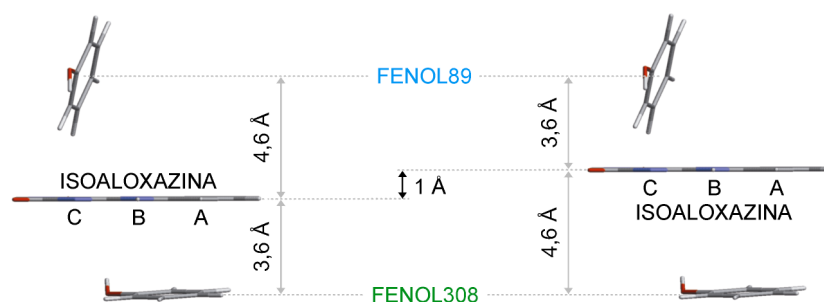
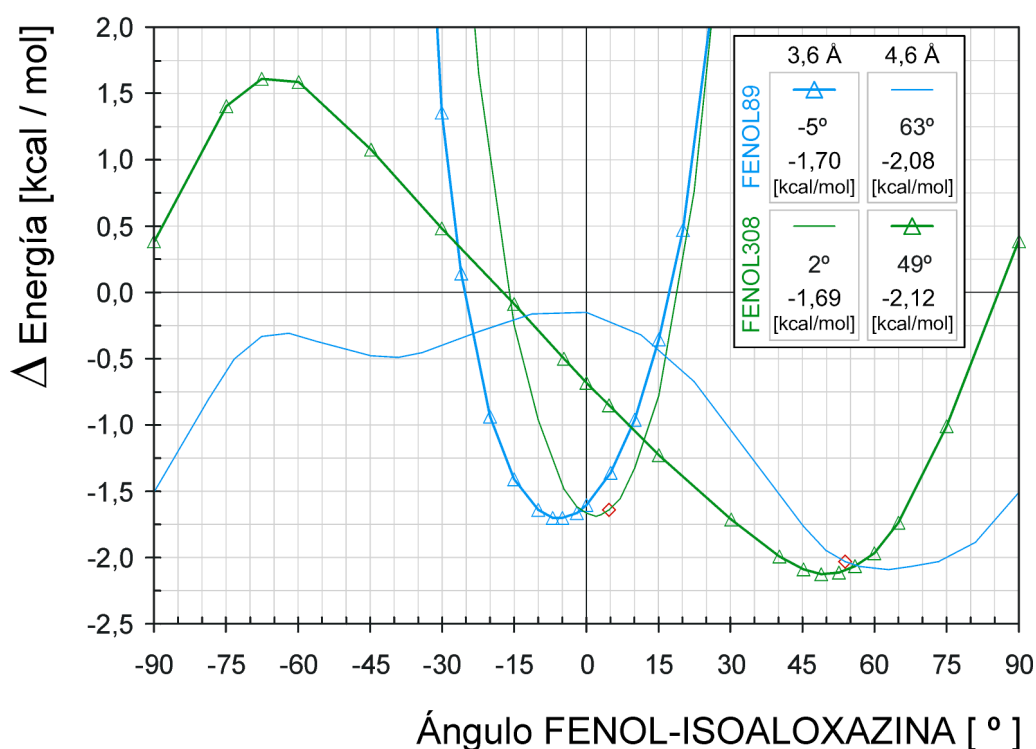
A**B**

Figura 6.5 Curvas de energía potencial asociadas a la rotación de las moléculas de FENOL89 y de FENOL308, dispuestas a diferentes distancias de la ISOALOXAZINA. **A**, Comparación entre el sistema presentado en la **Figura 6.1** (izquierda) y el sistema en el que la ISOALOXAZINA se desplazó 1 Å en dirección al FENOL89 (derecha), invirtiendo la relación de distancias entre cada molécula de fenol y la flavina. Se empleó la misma convención de ángulos de rotación que las definidas en la **Figuras 6.3** y **6.4**. **B**, Diagrama de energía potencial en función del ángulo diedro formado entre el plano de la ISOALOXAZINA y el FENOL89 a 3,6 Å (línea gruesa y triángulos en azul) o el FENOL308 a 4,6 Å (línea gruesa y triángulos en verde). Para facilitar su comparación se agregaron en líneas finas las curvas presentadas en las **Figuras 6.3** y **6.4**. Los sistemas FENOL89 (3,6 Å) / ISOALOXAZINA, y FENOL308 (4,6 Å) / ISOALOXAZINA se calcularon separadamente. Cada diferencia de energía se calculó con respecto a un sistema en cual las moléculas de FENOL y de ISOALOXAZINA se encontraban infinitamente alejadas en el espacio. En el recuadro se tabularon los mínimos globales de cada curva.

asociadas a la rotación de cada FENOL en sistemas compuestos por la ISOALOXAZINA y el FENOL89 o el FENOL308, dispuestos según el esquema de la derecha en la **Figura 6.5.A**. Para facilitar su comparación se incorporaron al gráfico las curvas de energía potencial de las **Figuras 6.3.B** y **6.4.B**. La curva correspondiente al FENOL89 (3,6 Å) presentó un mínimo global de energía de -1,70 kcal/mol correspondiente a un ángulo diedro de -5° , mientras que el FENOL308 (4,6 Å) mostró un mínimo global de energía de -2,12 kcal/mol para una conformación con un ángulo diedro de 49° . La comparación de las cuatro curvas deja en evidencia que la distancia FENOL-ISOALOXAZINA de los sistemas evaluados determinó para ambas moléculas de FENOL la magnitud del ángulo diedro y el valor de la energía relativa asociada a la interacción con la ISOALOXAZINA.

6.3 Discusión

La proximidad de las cadenas laterales de Y89 y Y308 de FNR a la flavina permite inferir *a priori* que ambos residuos establecen una interacción del tipo π - π con el grupo prostético. Estudios teóricos y experimentales indican que las interacciones aromáticas estabilizan dos tipos principales de geometrías denominadas *forma T* y *forma paralela desplazada* (84-86). La forma T implica una disposición de los anillos aromáticos con ángulos diedros mayores a 45° , un desplazamiento lateral no muy pronunciado y una distancia típica entre centroides de 4,5 Å a 5,5 Å. La forma paralela desplazada se refiere a una disposición aproximadamente coplanar de los anillos aromáticos llamada apilamiento de orbitales π , con una separación interplanar de 3,4 Å a 3,6 Å y un desplazamiento lateral de sus centroides de al menos 1,4 Å. Es aceptado que las formas paralelas *no* desplazadas, conocidas como *arreglos cara a cara* o enfrentados, sólo pueden estabilizarse si existe una gran complementariedad de cargas o

una polarización entre ambas moléculas del sistema, ya que los electrones π desfavorecen el arreglo exactamente apilado (84).

Los ángulos diedros y los desplazamientos laterales de los centroides de las cadenas laterales de Y89 y Y308 pueden observarse en el sistema modelo de la **Figura 6.1**. Resulta claro que la geometría del residuo Y89 puede clasificarse como una de las formas estables (forma T), en total acuerdo con la energía relativa calculada para la interacción del FENOL89 y la ISOALOXAZINA (**Tabla 6.2**). Por el contrario, la geometría del residuo Y308 resulta muy cercana a un arreglo cara a cara. En este caso, la energía relativa calculada también predijo una interacción atractiva (**Tabla 6.2**), en contradicción con el carácter repulsivo asignado a un arreglo enfrentado. Si bien el análisis de las cargas de Mulliken no reveló la existencia de una componente electrostática que pudiera justificar la estabilidad calculada, resulta una aproximación demasiado elemental para demostrar la ausencia de la misma. Aunque constituye un concepto muy útil, la carga atómica no es un parámetro mecánico-cuántico observable, por lo que su definición resulta arbitraria. Por lo tanto, pudiera suceder que las deficiencias del método de Mulliken al distribuir los electrones de acuerdo al grado de ocupación de los orbitales atómicos estuviera enmascarando un aporte electrostático en la interacción (189). Dos orbitales moleculares enlazantes con energías cercanas a los orbitales de frontera demostraron la deslocalización compartida de electrones π entre el FENOL308 y la ISOALOXAZINA, como se esperaba en una interacción aromática (**Figura 6.2**). Resulta notorio que a pesar de que el FENOL 308 se encuentra más enfrentado al anillo B de la ISOALOXAZINA (**Figura 6.1**), ambos orbitales moleculares recibieron la contribución de orbitales atómicos del anillo A.

Los ángulos correspondientes a los mínimos de energía potencial estimados para el sistema modelo y los ángulos diedros entre la isoaloxazina y las cadenas

laterales de los residuos Y89 y Y308 observados en la estructura de FNR de arveja, mostraron una notoria coincidencia (**Figuras 6.3 y 6.4**). En principio, esta concordancia indicaría que para una separación interplanar determinada, las interacciones de estas tirosinas con la isoaloxazina son las principales condicionantes de las geometrías observadas. El desplazamiento de la ISOALOXAZINA acercándose 1 Å en dirección del FENOL89 causó una variación mínima en la energía total del sistema (-0,05 kcal/mol, calculada como la suma de la estabilización debida la interacción de cada molécula de FENOL). Sin embargo, los mínimos de energía potencial para cada FENOL cambiaron drásticamente (**Figura 6.5**). La magnitud del desplazamiento de la ISOALOXAZINA se ajustó para provocar una inversión en las medidas de distancia interplanar respecto a cada molécula de FENOL. Sorprendentemente, las curvas de energía potencial correspondientes a la misma separación interplanar resultaron muy similares, a pesar de que los centroides de los anillos fenólicos se enfrentan a distintos anillos de la ISOALOXAZINA (**Figura 6.1**). Por lo tanto, el establecimiento del ángulo diedro de mínima energía entre la flavina y los residuos tirosina resultaría determinado en gran medida por la separación interplanar, antes que por la ubicación relativa a un anillo específico de la ISOALOXAZINA.

El desplazamiento de la flavina respecto a la posición que refleja en la estructura cristalográfica de la enzima silvestre estabilizó la interacción con el FENOL308 en 0,43 kcal/mol. Este resultado sugiere que existen interacciones con moléculas no incluidas en el sistema modelo que impiden al residuo Y308 adoptar una separación interplanar más favorable. Los residuos C266, G267 y L268 se ubican cerca de la cara de Y308 que no se enfrenta a la isoaloxazina, en una disposición que podría restringir la libertad de movimiento de la tirosina (**Figura 6.6**). Esta desestabilización de la tirosina terminal podría cumplir un papel en el mantenimiento de la funcionalidad

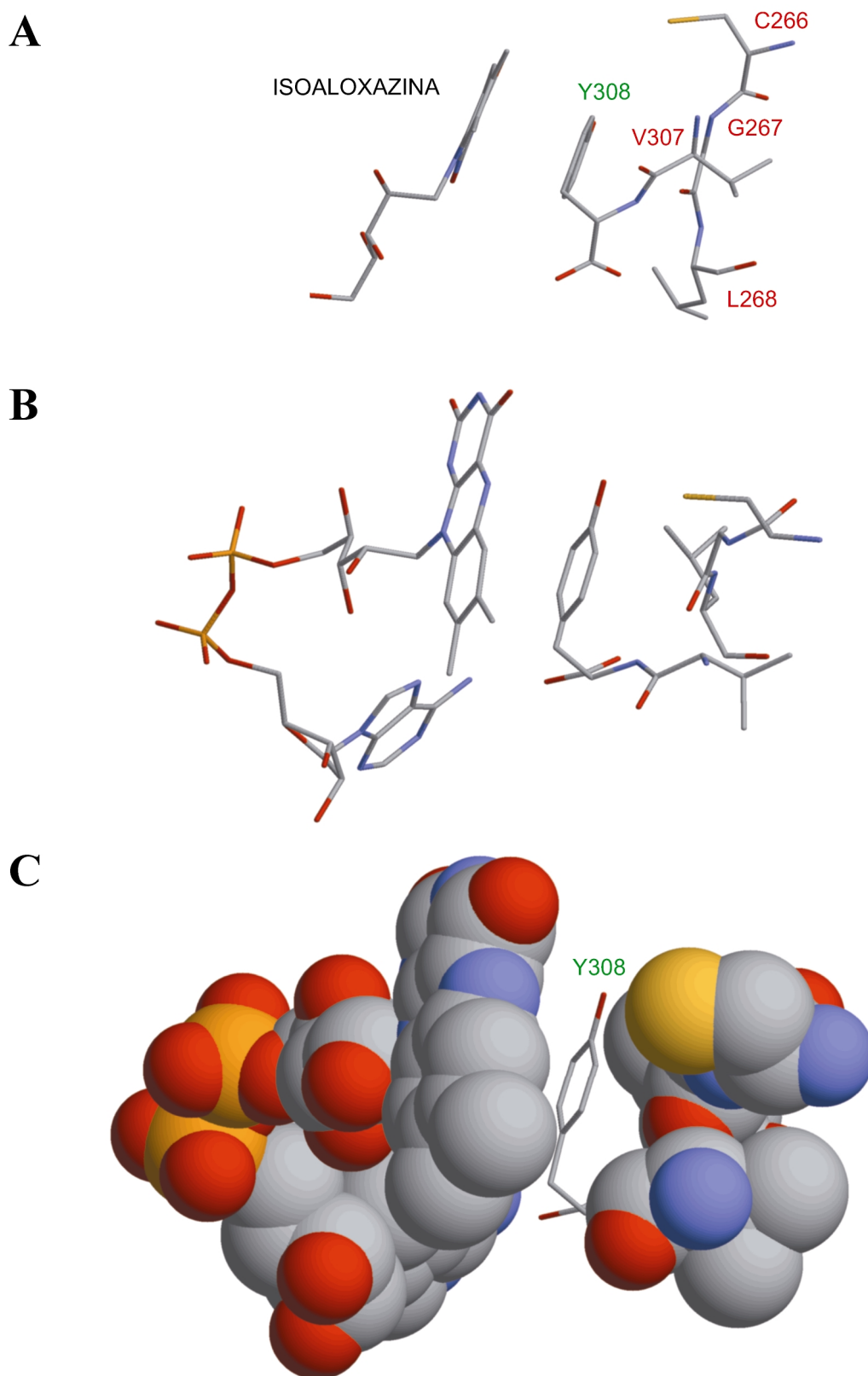


Figura 6.6 Residuos que acotarían la separación interplanar entre Y308 y la flavina. Las coordenadas espaciales corresponden al monómero A de ferredoxina-NADP⁺ reductasa de arveja (identificador PDB: 1QG0). **A**, Vista ilustrando la posición del residuo Y308 respecto al FAD y al grupo de residuos C266, G267 y L268. En esta vista no se incluyó la porción AMP del grupo prostético. **B**, Vista **A** luego de un giro de 90° según un eje horizontal. **C**, Vista **B** en representación CPK (Corey Pauling Kuntun).

de la enzima. En el capítulo anterior de esta Tesis se demostró que el residuo Y308 constituye un determinante de la especificidad para piridín nucleótidos. Uno de los requerimientos estructurales para ejercer esa función es la capacidad para competir por el mismo sitio con la porción nicotinamida del sustrato. Esta competencia debe ser equilibrada, ya que una interacción muy fuerte de Y308 en el sitio activo iría en detrimento de la constante catalítica de la enzima, como sucede en el caso de la mutante FNR Y308S en su interacción con NADP^+ (sección **5.2.3**). De este modo, los residuos C266, G267 y L268 actuarían como debilitantes de la interacción tirosina-isoaloxazina, imponiendo una cota para la separación interplanar entre la cadena lateral de Y308 y la flavina. La conservación estricta de los tres residuos en todas las secuencias de FNR conocidas hasta el presente (posiciones 295 a 297 en el alineamiento de la **Figura 3.1**) constituye una prueba adicional a favor de esta hipótesis.

7 CONCLUSIONES GENERALES

En la presente Tesis se ha estudiado la importancia evolutiva, funcional y estructural de los residuos aromáticos conservados en el sitio activo de las flavoproteínas de la superfamilia ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR), empleando como proteína modelo la FNR de arveja. A continuación se detallan las conclusiones obtenidas luego del análisis de los resultados expuestos en los capítulos anteriores:

1) La evolución de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa se estudió mediante la construcción de árboles filogenéticos basados en las secuencias de aminoácidos de las enzimas plásticas (FNR) y proteobacterianas (FPR). En el árbol filogenético de FNRs, la característica más destacable fue la inesperada relación evolutiva entre las enzimas de raíz y las de algas verdes, que fue explicada según un modelo de duplicación y pérdida diferencial de genes. Basándose en la importancia de la estructura primaria del extremo carboxilo terminal (que incluye a uno de los residuos aromáticos estudiados en este trabajo) en el mantenimiento de la función y la estructura terciaria de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa, se propuso una clasificación de las FPRs en tres subtipos (*E. coli*, *A. vinelandii* y *A. actinomycetemcomitans*). El análisis evolutivo basado en las secuencias aminoacídicas reveló que los subtipos de FPR se correspondieron con grupos filogenéticos claramente establecidos, brindando un fuerte soporte a la clasificación propuesta.

2) Se estudió el papel desempeñado por el residuo tirosina 89 en la estructura y función de FNR de arveja, mediante la caracterización de mutantes de FNR fusionadas a GST. La aromaticidad de la cadena lateral de la tirosina 89 resultó importante para la fijación del grupo prostético, aunque el grupo hidroxilo también contribuye en alguna

medida. El puente de hidrógeno que forma el grupo hidroxilo de la tirosina 89 con el ribitilo del FAD resultaría indispensable para definir una conformación adecuada para la interacción entre la lisina 110 y el NADP^+ , ya que la sustitución de la tirosina 89 por fenilalanina disminuyó dramáticamente la afinidad por este sustrato. La sustitución por triptofano prácticamente anuló la capacidad catalítica de la enzima, indicando que no es suficiente la aromaticidad del residuo para mantener una geometría compatible con la transferencia de hidruro.

3) Las estructuras cristalinas de los mutantes FNR Y308S y FNR Y308W de la enzima de arveja en complejos con NADP(H) proporcionaron por primera vez una visión de la unión productiva del sustrato piridín nucleótido a FNR. La sustitución del residuo tirosina carboxilo terminal produjo un aumento de la estabilidad de la interacción de la nicotinamida en el sitio activo, no afectó la geometría de unión del NADP(H) y mantuvo la efectividad de la catálisis.

4) Se demostró que en FNR la discriminación entre los sustratos NADP(H) y NAD(H) se establece gracias a dos determinantes. Un determinante realiza el reconocimiento específico y establece fuertes interacciones con el grupo diferencial, es decir el 2'-fosfato. El segundo determinante está constituido por la tirosina 308, que compite por la misma ubicación en el sitio activo con el grupo común a ambos sustratos, es decir el anillo de nicotinamida. Ambos determinantes contribuyen a la gran preferencia que exhibe FNR silvestre por NADPH . En la mutante FNR Y308S el segundo determinante resulta anulado, lo que ocasiona una importante disminución en la preferencia de la enzima por NADPH . El papel de Y308 como determinante de la especificidad NADPH/NADH en FNR provee un argumento adicional para explicar la gran conservación de este residuo entre las secuencias de FNR plastídicas conocidas hasta la fecha.

5) El modelado molecular de las interacciones entre la flavina y las tirosinas 89 y 308 de FNR de arveja, predijo que las mismas serían estabilizantes cuando estos residuos se ubican según la geometría que se observa en la estructura cristalográfica. El establecimiento del ángulo diedro de mínima energía entre la flavina y los residuos tirosina resultaría determinado en gran medida por la separación interplanar, antes que por la ubicación relativa a un anillo específico de la ISOALOXAZINA. Los residuos cisteína 266, glicina 267 y leucina 268 restringirían la libertad de movimiento de la tirosina 308, impidiéndole adoptar una separación interplanar asociada a una mayor estabilidad. Se sugiere que estos residuos actuarían debilitando la interacción Y308-flavina para moderar la competencia entre la tirosina terminal y la nicotinamida del sustrato.

8 RESUMEN

La ferredoxina-NADP⁺ reductasa presente en organismos fotosintéticos (FNR plastídica) es una flavoproteína de 35 kDa que cataliza el transporte reversible de electrones entre NADP(H) y ferredoxina o flavodoxina. La FNR plastídica es el prototipo de una superfamilia estructural que incluye proteínas de funciones diversas. Su estructura terciaria consta de un dominio amino terminal para la unión de una molécula del grupo prostético FAD y un dominio carboxilo terminal para la unión del sustrato NADP⁺. En todas las secuencias conocidas de FNR plastídicas se encuentran dos residuos tirosina estrictamente conservados que resultan homólogos a los residuos en posición 89 y 308 en la FNR de hojas de arveja, éste último ubicado en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Las estructuras cristalográficas de la enzima muestran que estas tirosinas se ubican a ambos lados de la flavina del FAD. Hasta el presente no existía información directa acerca de la geometría de unión de la parte nicotinamida del sustrato NADP⁺ a la enzima. En este trabajo de Tesis se empleó a la FNR de hojas de arveja como modelo para estudiar la importancia evolutiva, funcional y estructural de los residuos aromáticos conservados en el entorno de la flavina de las flavoproteínas pertenecientes a la superfamilia estructural ferredoxina-NADP⁺ reductasa.

Se estudió la evolución de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa mediante técnicas de Filogenia Molecular. Con este fin se construyeron árboles filogenéticos basados en las secuencias de aminoácidos de todas las enzimas plastídicas (FNR) y proteobacterianas (FPR) disponibles en las bases de datos. El análisis evolutivo de las FPRs permitió validar una clasificación de la flavoproteína en tres subtipos: subtipo *E. coli*, subtipo *A. vinelandii* y subtipo *A. actinomycetemcomitans*. Los subtipos propuestos

se distinguen por particularidades en la secuencia del extremo carboxilo terminal, que incluye al residuo homólogo a la tirosina 308 de FNR de arveja.

La caracterización de mutantes de FNR fusionadas a GST permitió estudiar el papel desempeñado por el residuo tirosina 89 en la estructura y función de FNR de arveja. Se demostró que la aromaticidad de la cadena lateral de la tirosina 89 resulta importante para la fijación del grupo prostético, con una contribución menor del puente de hidrógeno que forma el grupo hidroxilo del residuo con el ribitilo del FAD. Esta última interacción sería indispensable para definir una conformación adecuada que permita el acercamiento de la cadena lateral de la lisina 110 al puente pirofosfato del NADP^+ , ya que la sustitución de la tirosina 89 por fenilalanina disminuyó dramáticamente la afinidad por este sustrato. La aromaticidad del residuo en posición 89 no es el único requerimiento para mantener una geometría compatible con la transferencia de hidruro, ya que la sustitución del mismo por triptofano afectó profundamente la capacidad catalítica de la enzima.

Se dilucidó el modo de unión productivo del sustrato NADP^+ a FNR, mediante el estudio cristalográfico de los mutantes FNR Y308S y FNR Y308W de la enzima de arveja en complejos con NADP(H) . La sustitución del residuo tirosina en posición 308 produjo un aumento de la estabilidad de la interacción de la nicotinamida en el sitio activo, no afectó la geometría de unión del NADP(H) y mantuvo la efectividad de la catálisis.

Se demostró la existencia de un determinante adicional que contribuye a la capacidad de discriminación entre los sustratos NADP(H) y NAD(H) por parte de FNR. El sitio de unión para el 2'-fosfato del piridín nucleótido realiza el reconocimiento específico y establece fuertes interacciones con el grupo diferencial. El determinante

adicional está constituido por la tirosina 308, cuya cadena lateral compite por la misma ubicación en el sitio activo con la nicotinamida, grupo que es común a NADP(H) y NAD(H). En FNR silvestre ambos determinantes contribuyen para alcanzar una preferencia NADPH/NADH de 37100. La anulación del determinante adicional en la mutante FNR Y308S ocasiona una disminución de 500 veces en la preferencia de la enzima por NADPH.

El estudio *ab initio* de un sistema que modeló las interacciones entre la isoaloxazina y las cadenas laterales de las tirosinas 89 y 308 de FNR de arveja, permitió concluir que el ángulo diedro isoaloxazina-fenol en la geometría de mínima energía estaría determinado principalmente por la separación interplanar entre las dos moléculas. Se propone que el grupo de residuos cisteína 266, glicina 267 y leucina 268 impondría una cota a la separación interplanar entre la flavina y la cadena lateral de la tirosina 308, disminuyendo la estabilidad de la interacción entre ambas moléculas.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Mewies, M., McIntire, W.S. & Scrutton N.S. (1998) Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: The current state of affairs. *Protein Sci.* **2**, 2112-2133.
- 2 Ghisla, S. & Massey, V. (1989) Mechanism of flavoprotein-catalized reactions. *Eur. J. Biochem.* **181**, 1-17.
- 3 Bairoch, A., (1999) The ENZYME data bank in 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**, 310-311.
- 4 Knight, E.Jr. & Hardy, R.W. (1967) Flavodoxin. Chemical and biological properties. *J. Biol. Chem.* **242**, 1370-1374.
- 5 Weidenhaupt, M., Rossi, P., Beck, C., Fischer, H.M. & Hennecke, H. (1996) *Bradyrhizobium japonicum* possesses two discrete sets of electron transfer flavoprotein genes: *fixA*, *fixB* and *etfS*, *etfL*. *Arch. Microbiol.* **165**, 169-178.
- 6 Christie, J.M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. & Briggs, W.R. (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 8779-8783.
- 7 Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T. & Dixon, R. (1996) *Azotobacter vinelandii* NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 2143-2148.
- 8 Bibikov, S.I., Biran, R., Rudd, K.E. & Parkinson, J.S. (1997) A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **179**, 4075-4079.

- 9 Karplus, P.A. (1999) Structural Flavimology on the Brink. En *Flavins and Flavoproteins 1999* (S. Ghisla, P. Kroneck, P. Macheroux & H. Sund, editores) Rudolf Weber, Berlin, Germany, 233-238.
- 10 Fraaije, M. & Mateevi, Andrea (2000) Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 126-132.
- 11 Kyte, J. (1995) Coenzimes. En: *Mechanism in Protein Chemistry*. Garland Publishing, Inc., New York & London, pág. 72-89.
- 12 Visser, A.J. & Müller, F. (1980) Time-resolved fluorescence on flavins and flavoproteins. *Methods Enzymol.* **66**, 376-385.
- 13 Avron, M. & Jagendorf, A.T. (1956) A TPNH diaphorase from chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 475-490.
- 14 Shin, M. & Arnon, D.I. (1965) Enzymic mechanisms of pyridine nucleotide reduction in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **240**, 1405-1411.
- 15 Massey, V. & Hemmerich, P. (1980) Active-site probes of flavoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* **8**, 246-257.
- 16 Carrillo, N. & Vallejos, R.H. (1987) Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase. En *The Light Reactions. Topics in Photosynthesis* (Barber, J., ed) Vol. 8, pp. 527-560, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford.
- 17 Forti, G. & Sturani, E. (1968) On the structure and function of reduced nicotinamide dinucleotide phosphate-cytochrome f reductase of spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **3**, 461-472.
- 18 Gómez-Moreno, C., Medina, M., Hurley, J.K., Cusanovich, M.A., Markley, J.L., Cheng, H., Xia, B., Chae, Y.K. & Tollin, G. (1994) Protein engineering for the elucidation of the mechanism of electron transfer in redox proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 796-800.

- 19 Zanetti, G., Aliverti, A., Ravasi, D., Curti, B., Deng, Z. & Karplus, P.A. (1996) On the role of glutamate 312 of spinach ferredoxin-NADP⁺ reductase. En *Flavins and Flavoproteins* 1996 (Stevenson, K.J., Massey, V. & Williams, Jr., C.H., editores) University of Calgary Press, Canada, 509-512.
- 20 Vallejos, R.H., Ceccarelli, E.A. & Chan, R.L. (1984) Evidence for the Existence of a Thylakoid Intrinsic Binding Protein that Binds Ferredoxin NADP⁺ Oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **259**, 8048-8051.
- 21 Serra, E.C., Krapp, A.R., Ottado, J., Feldman, M.F., Ceccarelli, E.A., & Carrillo, N. (1995) The precursor of pea ferredoxin-NADP⁺ reductase synthesized in *Escherichia coli* contains bound FAD and is transported into chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **270**, 19930-19935.
- 22 Hanukoglu, I. & Gutfinger, T. (1989) cDNA sequence of adrenodoxin reductase. Identification of NADP⁺-binding sites in oxidoreductases. *Eur. J. Biochem.* **180**, 479-484.
- 23 Chen, Y.P. & Yoch, D.C. (1989) Isolation, characterization and biological activity of ferredoxin-NAD⁺ reductase from the methane oxidizer *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. Bacteriol.* **171**, 5012-5016.
- 24 Bianchi, V., Reichard, P., Eliasson, R., Pontis, E., Krook, M., Jörnvall, H. & Haggård-Ljungquist, E. (1993) *Escherichia coli* ferredoxin-NADP⁺ reductase: Activation of *E. coli* anaerobic nucleotide reduction, cloning of the gene (*fpr*), and overexpression of the protein. *J. Bacteriol.* **175**, 1590-1595.
- 25 Schrautemeier, B. & Bohme, H. (1985) A distinct ferredoxin for nitrogen fixation isolated from heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEBS Lett.* **184**, 304-308.
- 26 Pueyo, J.J., Gómez-Moreno, C. & Mayhew, S.G. (1991) Oxidation-reduction potentials of ferredoxin-NADP⁺ reductase and flavodoxin from *Anabaena* PCC 7119 and their electrostatic and covalent complexes. *Eur. J. Biochem.* **202**, 1065-1071.

- 27 Morigasaki, S., Jin, T. & Wada, K. (1993) Comparative studies on ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase isoenzymes derived from different organs by antibodies specific for the radish root-enzyme and leaf-enzyme. *Plant Physiol.* **103**, 435-440.
- 28 Bowsher, C.G., Hucklesby, D.P. & Emes, M.J. (1993) Induction of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase and ferredoxin synthesis in pea root plastids during nitrate assimilation. *Plant J.* **3**, 463-467.
- 29 Oelmüller, R., Bolle, C., Tyagi, A.K., Niekrawietz, N., Breit, S. & Herrmann, R.G. (1993) Characterization of the promoter from the single-copy gene encoding ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase from spinach. *Mol. Gen. Genet.* **237**, 261-272.
- 30 Aoki, H., Tanaka, K. & Ida, S. (1995) The genomic organization of the gene encoding a nitrate-inducible ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase from rice roots. *Biochim. Biophys. Acta* **1229**, 389-392.
- 31 Bianchi, V., Haggård-Ljungquist, E., Pontis, E. & Reichard, P. (1995) Interruption of the ferredoxin (flavodoxin) NADP⁺ oxidoreductase gene of *Escherichia coli* does not affect anaerobic growth but increases sensitivity to paraquat. *J. Bacteriol.* **177**, 4528-4531.
- 32 Krapp, A.R. & Carrillo, N. (1995) Functional complementation of the *mvrA* mutation of *Escherichia coli* by plant ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 215-221.
- 33 Krapp, A.R., Cortéz, N., Palatnik, J.F., Tognetti, V.B., Valle, E.M. & Carrillo, N. (1996) *Les liaisons dangereuses*: The flavoprotein ferredoxin-NADP⁺ reductase as propagator and scavenger of toxic oxygen derivatives. En *Flavins and Flavoproteins 1996* (Stevenson, K.J., Massey, V. & Williams, Jr., C.H., editores) University of Calgary Press, Canada, 85-88.
- 34 Newman, B.J. & Gray, J.C. (1988) Characterization of a full-length cDNA clone for pea ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Plant Mol. Biol.* **10**, 511-520.

- 35 Ceccarelli, E.A., Chan, R.L. & Vallejos, R.H. (1985) Trimeric Structure and other Properties of the Chloroplast Reductase Binding Protein. *FEBS Lett.* **190**, 165-168.
- 36 Ceccarelli, E.A., Viale, A.M., Krapp, A.R. & Carrillo, N. (1991) Expression, assembly and processing of higher plant ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 14283-14287.
- 37 Serra, E.C., Carrillo, N., Krapp, A.R. & Ceccarelli, E.A. (1993) One-step purification of plant ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione S-transferase. *Protein Express. Purif.* **4**, 539-546.
- 38 Ottado, J., Arakaki, A.K., Calcaterra, N.B. & Ceccarelli, E.A. (1994) Expression, assembly and secretion of a fully active plant ferredoxin-NADP⁺ reductase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **225**, 677-685.
- 39 Ottado, J. & Ceccarelli E.A. (1998) A fully active FAD-containing precursor remains folded up to its translocation across the chloroplast membranes. *Eur. J. Biochem.*, **253**, 132-138
- 40 Ceccarelli, E.A., Krapp, A.R., Serra, E.C. & Carrillo, N. (1996) Conformational requirements of a recombinant ferredoxin-NADP⁺ reductase precursor for efficient binding and import to isolated chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **238**, 192-197.
- 41 Karplus, P.A., Daniels, M.J. & Herriott, J.R. (1991) Atomic Structure of ferredoxin-NADP⁺ reductase: Prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* **251**, 60-66.
- 42 Yao, Y., Tamura, T., Wada, W., Matsubara, H. & Kodo, K. (1984) *Spirulina* ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase. The complete amino acid sequence. *J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 1513-1516.
- 43 Karplus, P.A., Walsh, K.A. & Herriott, J.R. (1984) Amino acid sequence of spinach ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase. *Biochemistry* **23**, 6576-6583.

- 44 Michalowski, O.B., Schmitt, J.M. & Bohnert, H.-J. (1989) Expression during salt stress and nucleotide sequence of cDNA for ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* **89**, 817-822.
- 45 Schluchter, W.M. & Bryant, D.A. (1992) Molecular characterization of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase in cyanobacteria: Cloning and sequence of the *petH* gene of *Synechococcus* sp. PCC 7002 and studies on the gene product. *Biochemistry* **31**, 3092-3102.
- 46 Jakowitsch, J., Bayer, M.G., Maier, T.L., Lüttke, A., Gebhart, U.B., Brandtner, M., Hamilton, B., Neumann-Spallart, C., Michalowski, C.B., Bohnert, H.-J., Schenk, H.E.A. & Löffelhardt, W. (1993) Sequence analysis of pre-ferredoxin-NADP⁺ reductase cDNA from *Cyanophora paradoxa* specifying a precursor for nucleus-encoded cyanelle polypeptide. *Plant Mol. Biol.* **21**, 1023-1033.
- 47 Fillat, M.F., Flores, E. & Gómez-Moreno, C. (1993) Homology of the N-terminal domain of the *petH* gene product from *Anabaena* sp. PCC 7119 to the *cpcD* phycobilisome linker polypeptide. *Plant Mol. Biol.* **22**, 725-729.
- 48 Lax, A.R. (1994) *Vicia faba* ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase precursor mRNA complete cds. *Gene Bank Accession* U14956.
- 49 Kitayama, M., Kitayama, K. & Togasaki, R.K. (1994) A cDNA clone encoding a ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **106**, 1715-1716.
- 50 Ritchie, S.W., Redinbaugh, M.G., Shiraishi, N., Vrba, J. & Campbell, W.H. (1994) Identification of a maize root transcript expressed in the primary response to nitrate: Characterization of a cDNA with homology to ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase. *Plant Mol. Biol.* **26**, 679-690.
- 51 Aoki, H., Doyama, N. & Ida, S. (1994) Sequence of a cDNA encoding rice (*Oryza sativa* L.) leaf ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Plant Physiol.* **104**, 1473-1474.

- 52 Choi, G., Przybylska, M. & Straus, D. (1995) Three abundant germ line specific transcripts in *Volvox carteri* encode photosynthetic proteins. *Gene Bank Accession* U22328.
- 53 Nakamura, N. (1998) *Arabidopsis thaliana* Estructural Analysis of *Arabidopsis thaliana* Chromosome 5. *Gene Bank Accession* AB011474.
- 54 Kumada, H.O., Aoki, H., Doyama, N. & Ida, S. (1998) Nucleotide sequence of a ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase cDNA from cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **116**, 1192
- 55 Bowsher, C.G. & Knight, J.S. (1996) The isolation of a pea root ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase cDNA. *Plant Physiol.* **112**, 861.
- 56 van Thor ,J.J., Hellingwerf, K.J. & Matthijs,H.C. (1998) Characterization and transcriptional regulation of the *Synechocystis* PCC 6803 petH gene, encoding ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase: Involvement of a novel type of divergent operator. *Plant Mol. Biol.* **36**, 353-363.
- 57 Hajirezaei, M., Krause, K.P. & Sonnewald, U. (1997) *Nicotiana tabacum* mRNA for ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Gene Bank Accession* Y14032.
- 58 Arakaki, A.K., Ceccarelli, E.A. & Carrillo, N. (1997) Plant Type ferredoxin-NADP⁺ reductases: A basal structural framework and a multiplicity of functions. *FASEB J.* **11**, 133-140.
- 59 Bruns, C.M. & Karplus, P.A. (1995) Refined crystal structure of spinach ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase at 1.7 Å resolution: Oxidized, reduced and 2'-phospho-5'-AMP bound states. *J. Mol. Biol.* **247**, 125-145.
- 60 Serre, L., Vellieux, F.M.D., Medina, M., Gómez-Moreno, C. Fontecilla-Camps J.C. & Frey M. (1996) X-ray Structure of the Ferredoxin:NADP⁺ Reductase from the Cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119 at 1.8 Å Resolution, and Crystallographic Studies of NADP⁺ Binding at 2.25 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **263**, 20-39.

- 61 Rossmann, M.H., Moras, D. & Olsen, K. (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* **250**, 194-199.
- 62 Lesk, A.M. (1995) NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 775-783.
- 63 Aliverti, A., Ferioli, C., Spinola, M., Raimondi, D., Zanetti, G., Finnerty, C., Faber, R. & Karplus, P.A. (1999) Structural and Functional Properties of Corn Root Ferredoxin-NADP⁺ Reductase. En *Flavins and Flavoproteins 1999* (S. Ghisla, P. Kroneck, P. Macheroux & H. Sund, editores) Rudolf Weber, Berlin, Germany, 265-268.
- 64 Correll, C.C., Ludwig, M.L., Bruns, C.M. & Karplus, P.A. (1993) Structural prototypes for an extended family of flavoprotein reductases. Comparison of phthalate dioxygenase reductase with ferredoxin reductase and ferredoxin. *Protein Sci.* **2**, 2112-2133.
- 65 Karplus, P.A. & Bruns, C.M. (1994) Structure-function relations for ferredoxin reductase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 89-99.
- 66 Ingelman M., Bianchi V. & Eklund H. (1997) The three-dimensional structure of flavodoxin reductase from *Escherichia coli* at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **268**, 147-157.
- 67 Sridhar Prasad G., Kresge N., Muhlberg A.B., Shaw A., Jung Y.S., Burgess B.K. & Stout C.D. (1998) The crystal structure of NADPH:ferredoxin reductase from *Azotobacter vinelandii*. *Protein Sci* **7**, 2541-2549.
- 68 Park, H.W., Kim, S.T., Sancar, A. & Deisenhofer, J. (1995) Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science* **268**, 1866-1872.
- 69 Sancar, A. & Sancar, G.B. (1984) *Escherichia coli* DNA photolyase is a flavoprotein. *J. Mol. Biol.* **172**, 223-227.

- 70 Sancar, A. (1994) Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* **33**, 2-9.
- 71 Correll, C.C., Batie, C.J., Ballou, D.P. & Ludwig, M.L. (1992) Phthalate dioxygenase reductase: A modular structure for electron transfer from pyridine nucleotides to [2Fe-2S]. *Science* **258**, 1604-1610.
- 72 Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G. Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Boume, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235-242.
- 73 Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T. & Chothia, C. (1995) SCOP: A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**, 536-540.
- 74 Ingelman, M., Ramaswamy, S., Nivière, V., Fontecave, M. & Eklund, H. (1999) Crystal Structure of NAD(P)H:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 7040-7049.
- 75 Lu, G., Campbell, W.H., Schneider, G. & Lindqvist, Y. (1994) Crystal structure of the FAD-containing fragment of corn nitrate reductase at 2.5 Å resolution: Relationship to other flavoprotein reductases. *Structure (London)* **2**, 809-821.
- 76 Nishida, H., Inaka, K., Yamanaka, M., Kaida, S., Kobayashi, K. & Miki, K. (1995) Crystal structure of NADH-cytochrome b5 reductase from pig liver at 2.4 Å resolution. *Biochemistry* **34**, 2763-2767.
- 77 Ermler, U., Siddiqui, R.A., Cramm, R. & Friedrich, B. (1995) Crystal structure of the flavohemoglobin from *Alcaligenes eutrophus* at 1.75 Å resolution. *EMBO J.* **14**, 6067-6077.
- 78 Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S. & Kim, J.J. (1997) Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 8411-8416.

- 79 Fontecave, M., Eliasson, R. & Reichard, P. (1987) NAD(P)H:flavin oxidoreductase of *Escherichia coli*. A ferric iron reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **262**, 12325- 12331.
- 80 Nivière V., Fieschi, F., Dècout, J.L. & Fontecave, M. (1996) Is the NAD(P)H:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*. a member of the Ferredoxin-NADP⁺ Reductase Family? *J. Biol. Chem.* **271**, 16656-16661.
- 81 Nivière, V, Vanoni, M.A., Zanetti, G. & Fontecave, M. (1998) Reaction of the NAD(P)H:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli* with NADPH and riboflavin: Identification of intermediates. *Biochemistry* **37**, 11879- 11887.
- 82 Ziegler G.A., Vonnrhein C., Hanukoglu G.E. & Schulz G.E. (1999) The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: Electron transfer for steroid biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **289**, 981-990.
- 83 Burley, S.K. & Petsko, G.A. (1985) Aromatic-aromatic interaction: A mechanism of protein structure stabilization. *Science* **229**, 23-28.
- 84 Hunter, C.A. & Sanders, J.K.M. (1990) The nature of π - π interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 5525-5534.
- 85 Hunter, C.A., Singh, J. & Thornton, J.M. (1991) π - π interactions: The geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. *J. Mol. Biol.* **218**, 837-846.
- 86 McGaughet, G.B., Gagné, M. & Rappé, A.K. (1998) π stacking interactions. *J. Biol. Chem.* **273**, 15458-15463.
- 87 Ricard, J., Nari, J. & Diamantidis, G. (1980) Complex-forming properties of spinach NADP⁺ reductase with ferredoxin, ferrocyanide and NADP⁺. *Eur. J. Biochem.* **108**, 55-66.

- 88 Batie, C.J. & Kamin, H. (1984a) Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase: Equilibria in binary and ternary complexes with NADP⁺ and ferredoxin. *J. Biol. Chem.* **259**, 8832-8839.
- 89 Zanetti, G., Aliverti, A. & Curti, B. (1984) A cross-linked complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase. *J. Biol. Chem.* **259**, 6153-6157.
- 90 Sancho, J. & Gómez-Moreno, C. (1991) Interaction of ferredoxin NADP⁺ reductase from *Anabaena* with its substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 231-238.
- 91 Batie, C.J. & Kamin, H. (1986) Association of ferredoxin-NADP⁺ reductase with NADP(H). Specificity and oxidation-reduction properties. *J. Biol. Chem.* **261**, 11214-11223.
- 92 Chan, R.L., Carrillo, N. & Vallejos, R.H. (1985) Isolation and sequencing of an active-site peptide from spinach ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase after affinity labeling with periodate-oxidized NADP⁺. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 172-177.
- 93 Cidaria, D., Biondi, P.A., Zanetti, G. & Ronchi, S. (1985) The NADP⁺-binding site of ferredoxin-NADP⁺ reductase. Sequence of the peptide containing the essential lysine residue. *Eur. J. Biochem.* **146**, 295-299.
- 94 Aliverti, A., Gadda, G., Ronchi, S. & Zanetti, G. (1991a) Identification of Lys116 as the target of N-ethylmaleimide inactivation of ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.* **198**, 21-24.
- 95 Aliverti, A., Lubberstedt, T., Zanetti, G., Herrmann, R.G. & Curti, B. (1991b) Probing the role of lysine 116 and lysine 244 in the spinach ferredoxin-NADP⁺ reductase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **266**, 17760-17763.
- 96 Medina, M., Méndez, E. & Gómez-Moreno, C. (1992a) Lysine residues on ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Anabaena* sp. PCC 7119 involved in substrate binding. *FEBS lett.* **298**, 25-28.

- 97 Medina, M., Méndez, E. & Gómez-Moreno, C. (1992b) Identification of arginyl residues involved in the binding of ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Anabaena* sp. PCC 7119 to its substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* **299**, 281-286.
- 98 Martínez-Júlvez, M., Hermoso, J., Hurley, J.K., Mayoral, T., Sanz-Aparicio, J., Tollin, G.; Gómez-Moreno, C. & Medina, M. (1998a) Role of Arg100 and Arg264 from *Anabaena* PCC 7119 ferredoxin-NADP⁺ reductase for optimal NADP⁺ binding and electron transfer. *Biochemistry* **37**, 17680-17691.
- 99 Pai, E., Karplus, P.A. & Schulz, G.E. (1988) Crystallographic analysis of the binding of NADPH, NADPH fragments, and NADPH analogues to glutathione reductase. *Biochemistry* **27**, 4465-4474.
- 101 Karplus, P.A. & Schulz, G.E. (1989) Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: Substrate crystal structures at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **210**, 163-180.
- 101 Stehle, T., Claiborne, A. & Schulz, G.E. (1993) NADH binding site and catalysis of NADH peroxidase. *Eur. J. Biochem.* **211**, 221-226.
- 102 Li, R., Bianchet, M.A., Talalay, P. & Amzel, L.M. (1995) The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: Mechanism of the two-electron reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 8846-8850.
- 103 Batie, C.J. & Kamin, H. (1984b) Electron transfer by ferredoxin:NADP⁺ reductase. Rapid-reaction evidence for participation of a ternary complex. *J. Biol. Chem.* **259**, 11976-11985.
- 104 Krakow, G., Ammeraal, R.N. & Vennesland, B. (1965) The stereospecificity of the Hill reaction with triphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* **240**, 1820-1823.

- 105 Foust, G.P., Mayhew, S.G. & Massey, V. (1969) Complex formation between ferredoxin triphosphopyridine nucleotide reductase and electron transfer proteins. *J. Biol. Chem.* **244**, 964-970.
- 106 Nelson, N. & Newman, J. (1969) Interaction between ferredoxin and ferredoxin nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reductase in pyridine nucleotide photoreduction and some partial reactions. *J. Biol. Chem.* **244**, 1926-1931.
- 107 Walker, M.C., Pueyo, J.J., Navarro, J.A., Gómez-Moreno, C. & Tollin, G. (1991) Laser flash photolysis studies of the kinetics of ferredoxins and ferredoxin-NADP⁺ reductases from *Anabaena* PCC 7119 and spinach: Electrostatic effects on intracomplex electron transfer. *Arch. Biochem. Biophys.*, **287**, 351-358.
- 108 Fillat, M.F., Edmondson, D.E. & Gomez-Moreno, C. (1990) Structural and chemical properties of a flavodoxin from *Anabaena* PCC 7119. *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 301-307.
- 109 Pueyo, J.J., Revilla, C., Mayhew, S.G. y Gómez-Moreno, C. (1992) Complex formation between ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Anabaena* PCC7119. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 367-372.
- 110 Pirola, M.C., Monti, F., Aliverti, A. & Zanetti, G. (1994) A functional heterologous Electron-Transfer Protein Complex: *Desulfovibrio vulgaris* Flavodoxin Covalently Linked to Spinach Ferredoxin-NADP⁺ Reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 480-486.
- 111 Zanetti, G., Morelli, D., Ronchi, S., Negri, A., Aliverti, A. & Curti, B. (1988) Structural studies on the interaction between ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Biochemistry* **27**, 3753-3759.
- 112 Aliverti, A. & Zanetti, G. (1997) A three-domain iron-sulfur flavoprotein obtained through gene fusion of ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase from spinach leaves. *Biochemistry* **36**, 14771-14777.

- 113 Aliverti, A., Corrado, M.E. & Zanetti, G. (1994) Involvement of lysine-88 of spinach ferredoxin-NADP⁺ reductase in the interaction with ferredoxin. *FEBS Lett.* **343**, 247-250.
- 114 Hurley, J.K., Medina, M., Gomez-Moreno, C. & Tollin, G. (1994) Further characterization by site-directed mutagenesis of the protein-protein interface in the ferredoxin/ferredoxin:NADP⁺ reductase system from *Anabaena*: Requirement of a negative charge at position 94 in ferredoxin for rapid electron transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 480-486.
- 115 Navarro, J.A., Hervás, M., Genzor, C.G., Cheddar, G., Fillat, M.F., De la Rosa, M.A., Gómez-Moreno, C., Cheng, H., Xia, B. & Chae, Y.K. (1995) Site-specific mutagenesis demonstrates that the structural requirements for efficient electron transfer in *Anabaena* ferredoxin and flavodoxin are highly dependent on the reaction partner: Kinetic studies with photosystem I, ferredoxin:NADP⁺ reductase, and cytochrome *c*. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**, 229-238.
- 116 Hurley, J.K., Schmeits, J.L., Genzor, C., Gómez-Moreno, C. & Tollin, G. (1996) Charge reversal mutations in a conserved acidic patch in *Anabaena* ferredoxin can attenuate or enhance electron transfer to ferredoxin:NADP⁺ reductase by altering protein/protein orientation within the intermediate complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 243-250.
- 117 Hurley, J.K., Weber-Main, A.M., Stankovich, M.T., Benning, M.M., Thoden, J.B., Vanhooke, J.L., Holden, H.M., Chae, Y.K., Xia, B., Cheng, H., Markley, J.L., Martínez-Júlvez, M., Gómez-Moreno, C., Schmeits, J.L. & Tollin, G. (1997) Structure-function relationships in *Anabaena* ferredoxin: Correlations between X-ray crystal structures, reduction potentials, and rate constants of electron transfer to ferredoxin:NADP⁺ reductase for site-specific ferredoxin mutants. *Biochemistry* **36**, 11100-11117.
- 118 Aliverti, A., Livraghi, A., Piubelli, L. & Zanetti, G. (1997) On the role of the acidic cluster Glu 92-94 of spinach ferredoxin I. *Biochim. Biophys. Acta* **1342**, 45-50.

- 119 Medina, M., Martínez-Júlvez, M., Hurley, J.K., Tollin, G. & Gomez-Moreno, C. (1998) Involvement of glutamic acid 301 in the catalytic mechanism of ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Anabaena* PCC 7119. *Biochemistry* **37**, 2715-2728.
- 120 Martínez-Júlvez, M., Medina, M., Hurley, J.K., Hafezi, R., Brodie, T.B., Tollin, G. & Gómez-Moreno, C. (1998b) Lys75 of *Anabaena* ferredoxin-NADP⁺ reductase is a critical residue for binding ferredoxin and flavodoxin during electron transfer. *Biochemistry* **37**, 13604-13613.
- 121 Schmitz, S., Martínez-Júlvez, M., Gómez-Moreno, C. & Böhme, H. (1998) Interaction of positively charged amino acid residues of recombinant, cyanobacterial ferredoxin:NADP⁺ reductase with ferredoxin probed by site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 89-93.
- 122 Aliverti, A., Deng, Z., Ravasi, D., Piubelli, L., Karplus, P.A. & Zanetti, G. (1998) Probing the function of the invariant glutamyl residue 312 in spinach ferredoxin-NADP⁺ reductase. *J. Biol. Chem.* **273**, 34008-34016.
- 123 Hurley, J.K., Hazzard, J.T., Martínez-Júlvez, M., Medina, M., Gómez-Moreno, C. & Tollin, G. (1999) Electrostatic forces involved in orienting *Anabaena* ferredoxin during binding to *Anabaena* ferredoxin:NADP⁺ reductase: Site-specific mutagenesis, transient kinetic measurements, and electrostatic surface potentials. *Protein Sci.* **8**, 1614-1622.
- 124 Faro, M., Medina, M., Gómez-Moreno, C., Hurley, J.K., Brodie, T.B. & Tollin, G. Role of Glutamic Acid 139 in the Catalytic Mechanism of Ferredoxin-NADP⁺ Reductase from *Anabaena* PCC7119. (1999). En *Flavins and Flavoproteins 1999* (S. Ghisla, P. Kroneck, P. Macheroux & H. Sund, editores) Rudolf Weber, Berlin, Germany, 273-276.
- 125 Massey, V., Mathews, R.G., Foust, G.P., Howell, L.G., Williams, C.H., Zanetti, G. & Ronchi, S. (1970) NADPH diaphorase from chloroplasts. En *Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases* (Sund, H., editor) Springer-Verlag, Heidelberg, 393-409.

- 126 Keirns, J.J. & Wang, J.H. (1972) Studies on nicotinamide dinucleotide phosphate reductase of spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **247**, 7374-7382.
- 127 Orellano, E.G., Calcaterra, N.B., Carrillo, N. & Ceccarelli, E.A. (1993) Probing the role of the carboxyl terminal region of plant ferredoxin-NADP⁺ reductase by site-directed mutagenesis and deletion analysis. *J. Biol. Chem.* **268**, 19267-19273.
- 128 Aliverti, A., Bruns, C. M., Pandini, V. E., Karplus, P. A., Vanoni, M. A., Curti, B., & Zanetti, G. (1995) Involvement of serine 96 in the catalytic mechanism of ferredoxin-NADP⁺ reductase: Structure-function relationship as studied by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography. *Biochemistry* **34**, 8371-8379.
- 129 Aliverti, A., Piubelli, L., Zanetti, G. Lübberstedt, T., Herrman, R.G. & Curti, B. (1993) The role of cysteine residues of spinach ferredoxin-NADP⁺ reductase as assessed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **32**, 6374-6380.
- 130 Mayoral, T., Medina, M., Sanz-Aparicio, J., Gómez-Moreno, C. & Hermoso, J.A. (2000) Structural Basis of the Catalytic Role of Glu301 in *Anabaena* PCC 7119 Ferredoxin-NADP⁺ Reductase Revealed by X-Ray Crystallography. *Proteins* **38**, 60-60.
- 131 Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- 132 Altschul, S.F., Thomas L.M., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- 133 Felsenstein, J. (1989) PHYLIP, Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.

- 134 Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. & Orcutt, B.C. (1978) A model of evolutionary change in proteins. En *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Dayhoff, M.O., editor) National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, **5**, 345-452.
- 135 Saitou, N. & Nei, M. (1987) The Neighbor-joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- 136 Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- 137 Page, R.D.M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-358.
- 138 Feller, D. & Davidson, E.R. (1990) Basis Sets for Ab Initio Molecular Orbital calculations and Intermolecular Interactions. *Reviews in Computational Chemistry* **1**, 1-43.
- 139 Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. (Segunda edición). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 140 Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988) Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- 141 Ottado, J., Calcaterra, N.B., Arakaki, A.K., Orellano, E.G., Carrillo, N. & Ceccarelli E.A. (1996) On the role of aromatic amino acids interacting with FAD in plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductases. En *Flavins and Flavoproteins 1996* (Stevenson, K.J., Massey, V. & Williams, Jr., C.H., editores) University of Calgary Press, Canada, 501-504.
- 142 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- 143 Sedmak, J. & Grossberg, S. (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Biochem.* **79**, 544-552.
- 144 Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.
- 145 Zanetti, G. (1976) A lysil residue at the NADP⁺ binding site of ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **445**, 14-24.
- 146 Gadda, G., Aliverti, A., Ronchi, S. & Zanetti, G. (1990) Structure-function relationship in spinach ferredoxin-NADP⁺ reductase as studied by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* **265**, 11955-11959.
- 147 Deng, Z., Aliverti, A., Zanetti, G., Arakaki, A.K., Ottado, J., Orellano, E.G., Calcaterra, N.B., Ceccarelli, E.A., Carrillo, N. & Karplus, A. (1999) A productive NADP⁺ binding mode of ferredoxin-NADP⁺ reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies. *Nature Struct. Biol.* **6**, 847-853.
- 148 Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods in Enzymology* **276**, 307-326.
- 149 Leslie, A.G.W. (1992) CCP4 and ESF-EACMB. *Newsletters on Protein Crystallography* **26**.
- 150 Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 Suite: Program for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763.
- 151 Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr.* **A50**, 157-163.
- 152 Brünger, A.T. (1992) X-PLOR, a system for crystallography and NMR, Version 3.1. Yale Univ. Press, New Haven, CT.

- 153 Li, W.H. & Graur, D. (1991) Fundamentals of Molecular Evolution. (Primera edición). Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 99-135.
- 154 Zuckerkandl, E. & Pauling, L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theoret. Biol.* **8**, 357-366.
- 155 Kimura, M. (1983) The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, London.
- 156 Felsenstein, J. (1988) Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 521-565.
- 157 Calcaterra, N. B., Picó, G. A., Orellano, E. G., Ottado, J., Carrillo, N. & Ceccarelli, E. A. (1995) Contribution of the FAD binding site residue tyrosine 308 to the stability of pea ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase. *Biochemistry* **39**, 12842-12848.
- 158 Jung, Y.S., Roberts, V.A., Stout, C.D. & Burgess, B.K. (1998) Complex formation between *Azotobacter vinelandii* Ferredoxin I and its physiological electron donor NADPH-ferredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* **274**, 2978-2987.
- 159 Stout, C.D. (1989) Refinement of the 7 Fe ferredoxin from *Azotobacter vinelandii* at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **205**, 545-555.
- 160 Woese, C. (1987) Bacterial Evolution. *Microb. Rev.* **51**, 221-271.
- 161 Viale, A. M. & Arakaki, A.K. (1994) The Chaperonin Connection to the Origins of the Eukaryotic Organelles. *FEBS letters* **341**, 146-151.
- 162 Viale, A.M., Arakaki, A.K., Soncini, F.C. & Ferreyra, R.G. (1994) Evolutionary Relationships among Eubacterial Groups as Inferred from GroEL (Chaperonin) Sequence Comparisons. *Int. J. Syst. Bact.* **44**, 527-533.
- 163 Helmchen, T.A., Bhattacharya, D. & Melkonian, M. (1995) Analyses of Ribosomal RNA Sequences from Glaucocystophyte Cyanelles Provide New

- Insights into the Evolutionary Relationships of Plastids. *J. Mol. Evol.* **41**, 203-210.
- 164 Arakaki, A.K. & Viale, A.M. (1995) Origins of organelles in plants and algae as inferred from comparisons of highly conserved chaperone proteins. En *Progress Research in Photosynthesis* (Mathis, P. editor) Kluwer, Dordrecht, 971-974.
- 165 Lake, J.A & Moore J.E. (1998) Phylogenetic analysis & comparative genomics. Trends Guide to Bioinformatics Supplement 22-23.
- 166 Piubelli, L., Aliverti, A., Arakaki, A.K., Carrillo, N., Ceccarelli, E.A., Karplus, P.A. & Zanetti, G. (2000) Competition between C-terminal Tyrosine and Nicotinamide Modulates Pyridine Nucleotide Affinity and Specificity in Plant Ferredoxin-NADP⁺ Reductase. *J. Biol. Chem.* **275**, 10472-10476.
- 167 Zanetti, G., Cidaria, D. & Curti, B. (1982) Preparation of apoprotein from spinach ferredoxin-NADP⁺ reductase. Studies on the resolution process and characterization of the FAD reconstituted holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **198**, 21-24.
- 168 Cornish-Bowden, A. (1995) Fundamentals of Enzyme Kinetics. (Edición revisada), Portland Press Ltd, London.
- 169 Adolph, H.W., Kiefer, M. & Cedergren-Zeppezauer, E. (1997) Electrostatic Effects in the Kinetics of Coenzyme Binding to Isozymes of Alcohol Dehydrogenase from Horse Liver. *Biochemistry* **36**, 8743-8754.
- 170 Krauth-Siegel, R.L., Arscott, L.D., Schönleben-Janás, A., Schirmer, R.H. & Williams, C.H. Jr. (1998) Role of active site tyrosine residues in catalysis by human glutathione reductase. *Biochemistry* **37**, 13968-13977.
- 171 Scrutton, N.S., Berry, A. & Perham, R.N. (1990) Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* **343**, 38-43.

- 172 Feeney, R., Clarke, A.R. & Holbrook, J.J. (1990) A single amino acid substitution in lactate dehydrogenase improves the catalytic efficiency with an alternative coenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 667–672.
- 173 Fan, F., Lorenzen, A.J. & Plapp, B.V. (1991) An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase I determines the specificity for coenzyme. *Biochemistry* **30**, 6397–6401.
- 174 Nishiyama, M., Birktoft, J.J. & Beppu, T. (1993) Alteration of coenzyme specificity of malate dehydrogenase from *Thermus flavus* by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 4656–4660.
- 175 Bocanegra, J.A., Scrutton, N.S. & Perham, R.N. (1993) Creation of an NADP-dependent pyruvate dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering. *Biochemistry* **32**, 2737–2740.
- 176 Sem, D.S. & Kasper, C.B. (1993) Interaction with arginine 597 of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase is a primary source of the uniform binding energy used to discriminate between NADPH and NADH. *Biochemistry* **32**, 11548–11558.
- 177 Mittl, P.R.E., Berry, A., Scrutton, N.S., Perham, R.N. & Schulz, G.E. (1994) Anatomy of an engineered NAD-binding site. *Protein Sci.* **3**, 1504–1514.
- 178 Chen, R., Greer, A. & Dean, A.M. (1995) A highly active decarboxylating dehydrogenase with rationally inverted coenzyme specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11666–11670.
- 179 Didierjean, C., Rahuel-Clermont, S., Vitoux, B., Dideberg, O., Branlant, G. & Aubry, A. (1997) A crystallographic comparison between mutated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Bacillus stearothermophilus* complexed with either NAD⁺ or NADP⁺. *J. Mol. Biol.* **268**, 739–759.
- 180 Shiraishi, N., Croy, C., Kaur, J. & Campbell, W.H. (1998) Engineering of pyridine nucleotide specificity of nitrate reductase: mutagenesis of recombinant

- cytochrome b reductase fragment of *Neurospora crassa* NADPH:Nitrate reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **358**, 104–115.
- 181 Tejero, J., Luquita, A., Grever, A., Gómez-Moreno, C. & Perham, R. (1999) Determinants of Cofactor Specificity in *Anabaena* PCC 7119 Ferredoxin-NADP⁺ Reductase. En *Flavins and Flavoproteins 1999* (S. Ghisla, P. Kroneck, P. Macheroux & H. Sund, editores) Rudolf Weber, Berlin, Germany, 293-296.
- 182 Jorgensen, W.L. & Severance, D.L. (1990) Aromatic-Aromatic Interactions: free Energy Profiles for the Benzene Dimer in Water, Chloroform, and Liquid Benzene. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4768-4774.
- 183 Serrano, L., Bycroft, M. & Fersht, A.R. (1991) Aromatic-Aromatic Interactions and Protein Stability. Investigation by Double-mutant Cycles. *J. Mol. Biol.* **218**, 465-475.
- 184 Carver, F.J., Hunter, C.A. & Seward, E.M. (1998) Structure-activity relationship for quantifying aromatic interactions. *Chem. Commun.* 775-776
- 185 Brocchieri, L. & Karlin S. (1994) Geometry of interplanar residue contact in protein structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9297–9301.
- 186 Boyd, D.B. (1990) Aspects of Molecular Modeling. En *Reviews in Computational Chemistry* (Lipkowitz, K.B. & Boyd, D.B., editores) Indiana University Purdue, University at Indianapolis, USA, **1**, 321-354.
- 187 Zheng, Y & Ornstein, RL (1996) A theoretical study of the structures of flavin in different oxidation and protonation states. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9402-9408.
- 188 Szabo, A. & Ostlund, N.S. (1989) Configuration Interaction. En *Modern Quantum Chemistry. Introduction to Advance Electronic Structure Theory*. (Edición revisada). McGraw-Hill, New York, USA, 231-270.

- 189 Bachrach, S.M. (1994) Population Analysis and Electron Densities from Quantum Mechanics. En *Reviews in Computational Chemistry* (Lipkowitz, K.B. & Boyd, D.B., editores) Indiana University Purdue, University at Indianapolis, USA, **5**, 171-227.